

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

MARIEM EL SAYAH

**ANÁLISE DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS RESPOSTAS
CONTRÁTEIS INDUZIDAS POR AGONISTAS B₁ E B₂ PARA AS
CININAS NA ÍRIS DE PORCO *IN VITRO***

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. João B. Calixto

**Florianópolis
2004**

AGRADECIMENTOS

Em especial a minha mãe – Naides B. El Sayah – e ao meu irmão – Mohamed A .

El Sayah, minha grande família pelo amor e carinho durante toda minha vida.

Ao professor João Batista Calixto, por ter me concedido a oportunidade de entrar para a carreira científica, e abrir as portas para uma nova perspectiva profissional, além do exemplo como profissional.

Aos professores do Departamento pela transmissão do conhecimento científico adquirido durante a minha formação.

A Elizabeth Soares Fernandes, Rodrigo Medeiros, Juliano Ferreira e Rosana Ostroski, que colaboraram no desenvolvimento de alguns experimentos, sugestões e discussões.

Com muito carinho, à grande amiga de longa jornada Maria Martha Campos por todas as sugestões feitas ao trabalho, até a sua elaboração final.

Aos amigos da iniciação científica, mestrado, doutorado e a Patrícia que dividiram muitos momentos comigo.

Aos colegas farmacêuticos e funcionários do Serviço de Farmácia – HU, que me apoiaram, incentivaram e colaboraram para que eu conseguisse vencer mais um objetivo da minha vida.

Aos profissionais do Frigorífico Frigovalle, sem o apoio deles não teria sido possível realizar este trabalho, e à técnica da UNIVALI e também amiga Martina que, colaborou para que os olhos de porco chegassem até Florianópolis.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia.

El Sayah, Mariem. **Análise dos mecanismos envolvidos nas respostas contráteis induzidas por agonistas B₁ e B₂ para as cininas na íris de porco “in vitro”**. Florianópolis, 2004, 115p. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: João Batista Calixto

Defesa: 13/10/2004

Este trabalho demonstrou que a contração induzida pela BK na íris isolada de porco é mediada pelos receptores B₂, com liberação neuronal de ACh, noradrenalina, neuropeptídeos e derivados do ácido araquidônico, através das vias das COX-1, COX-2, LOX e TXA₂. Além disso, demonstrou o envolvimento do influxo de cálcio do meio extracelular, através dos canais de cálcio do tipo L, N e P, bem como a possível participação das PKA e PKC mediando as ações da BK na íris. Os estudos também mostram que os receptores B₁ não são constitutivos nessa preparação, no entanto, após 4 h de incubação com LPS, ocorre a ativação dos receptores B₁, por meio de mecanismos dependentes da síntese protéica e de fatores de transcrição, como o NF-κB. A via das MAPKs, especialmente MEK-1, p38-MAPK e fosfatidilinositol 3-quinase, além de estarem envolvidas na indução dos receptores B₁, também participam dos mecanismos que regulam as ações do receptor B₁ após a indução com LPS. Além disso, confirma-se a participação das MEK-1 e p38-MAPK por meio dos estudos de biologia molecular. Por outro lado, demonstra-se que os neuropeptídeos como o NK₁, NK₂, NK₃ e CGRP não participam das respostas contráteis induzidas pela des-Arg⁹-BK nessa preparação. Todavia, apresentam dependência significativa do cálcio extracelular, através dos canais de cálcio do tipo L e não do tipo N. Os resultados contribuem para melhor compreensão de alguns dos mecanismos envolvidos na regulação dos receptores de cininas B₁ e B₂ na íris isolada de porco. Além disso, geram subsídios para o melhor entendimento dos processos inflamatórios e dolorosos, como também para o desenvolvimento futuro de terapias antiinflamatórias e analgésicas.

Palavras-chave: bradicinina; des-Arg⁹-BK; íris de porco; canais de cálcio; neuropeptídeos; proteínas quinases.

ABSTRACT

In the present work we demonstrated that the contraction induced by the BK in the pig isolated iris, is mediated by the B₂ receptor, with neuronal release of ACh, NOR, neuropeptides acting in NK₁, NK₂, NK₃, CGRP and the derivatives of the araquidonic acid, through the enzymes COX-1, COX-2 and LOX as TXA₂. Moreover, the involvement extracellular of the calcium influx through the calcium channel type L, N and P was demonstrated, as well as the possible participation of PKA and PKC. This study also demonstrated that the B₁ receptor is not constitutive in this preparation, however 4 h after the incubation of the preparations with LPS occurs the time-dependent induction of this receptor in the iris, through mechanisms dependent on protein synthesis and transcription factors such as NF-κB. The MAPKs pathway, especially MEK-1, p38 MAPK and fosfatidylinositol 3-quinase, besides being involved in the induction of B₁ receptors, also participate on the mechanisms that regulate the actions of B₁ after the induction with LPS. Also the role of MEK-1 and p38 MAPK was confirmed through the molecular biology studies. Moreover, it was demonstrated that the neuropeptides NK₁, NK₂, NK₃ and CGRP, do not participate of the contraction induced by des-Arg⁹-BK in this preparation, however, they present a significant dependence of extracellular calcium through calcium channels of L but not N type. Ours results contribute to a better understanding of some of the mechanisms involved in the regulation of kinin B₁ and B₂ receptors in the pig isolated iris. Moreover, it leads to a better comprehension of the inflammatory and painful processes, contributing to the future development of anti-inflammatory and analgesia therapies.

Key-words: bradykinin; des-Arg⁹-BK; pig iris sphincter; calcium channel; protein kinases; neuropeptides.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS	iv
1 INTRODUÇÃO	10
1.1 ÍRIS – ANATOMIA E FISIOLOGIA	10
1.2 HISTÓRICO DO SISTEMA CALICREÍNAS-CININAS	14
1.3 VIAS DE SÍNTESE E DEGRADAÇÃO DAS CININAS	16
1.4 RECEPTORES PARA AS CININAS	18
1.4.1 Estudos com Antagonistas e Radioligantes	19
1.4.2 Clonagem e Seqüenciamento	21
1.4.3 Padrão de Expressão	23
1.4.4 Indução do Receptor B ₁	24
1.5 PARTICIPAÇÃO DAS CININAS NO SISTEMA OCULAR	26
2 OBJETIVOS	28
2.1 OBJETIVO GERAL	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 ANIMAIS.....	29
3.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	29
3.2.1 Estudos <i>in vitro</i>	29
3.2.2 Análise das respostas contráteis induzidas pelas cininas na íris isolada de porco	31
3.2.3 Análise da participação dos sistemas simpático e parassimpático nas respostas contráteis induzidas pela BK na íris isolada de porco	32
3.2.4 Estudo do envolvimento dos metabólitos derivados da via do ácido araquidônico nas respostas contráteis induzidas pela BK na íris isolada de porco	32
3.2.5 Influência do cálcio extracelular e dos canais de cálcio nas respostas contráteis induzidas pela BK na íris isolada de porco	33
3.2.6 Participação dos neuropeptídeos nas respostas contráteis induzidas pela BK na íris isolada de porco	34
3.2.7 Participação das proteínas quinases na resposta contrátil induzida pela BK na íris isolada de porco	35
3.2.8 Indução <i>in vitro</i> do receptor B ₁ para as cininas após incubação com LPS	35
3.2.9 Caracterização funcional dos mecanismos envolvidos na indução <i>in vitro</i> do receptor B ₁ para as cininas após incubação com LPS	36
3.2.10 Efeito dos inibidores seletivos na indução do receptor B ₁ após a incubação <i>in vitro</i> de LPS	37
3.3 ESTUDOS COM TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR.....	39
3.3.1 Preparação dos tecidos	39
3.3.2 Extração de proteínas citosólicas e nucleares.....	40

3.3.3 Ensaio de <i>Western Blot</i>	41
3.4 DROGAS E REAGENTES	41
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
 4 RESULTADOS	 44
4.1 Análise das respostas contráteis induzidas pelas cininas na íris isolada de porco	44
4.2 Análise da participação do ácido araquidônico nas respostas contráteis induzidas pela BK na íris isolada de porco.....	46
4.3 Análise do possível papel das proteínas quinases (PKs) na resposta contrátil induzida pela BK	48
4.4 Participação dos canais de cálcio nas respostas contráteis induzidas pela BK na íris isolada de porco	49
4.5 Estudo da transmissão colinérgica, noradrenérgica e de canais de sódio sobre as respostas contráteis induzidas pela BK na íris isolada de porco	51
4.6 Influência dos neuropeptídeos nas respostas contráteis induzidas pela BK na íris isolada de porco	52
4.7 Estudo das respostas contráteis induzidas pelos agonistas do receptor B ₁ na íris isolada de porco após tratamento com LPS	55
4.8 Efeito dos antagonistas do receptor B ₁ sobre as respostas contráteis induzidas pela des-Arg ⁹ -BK na íris isolada de porco.....	56
4.9 Efeito dos metabólitos do ácido araquidônico nas respostas contráteis induzidas pela des-Arg ⁹ -BK na íris isolada de porco.....	58
4.10 Efeito dos inibidores das proteínas quinases sobre as respostas contráteis induzidas pela des-Arg ⁹ -BK na íris isolada de porco..	60
4.11 Participação dos canais de cálcio nas respostas contráteis induzidas pela des-Arg ⁹ -BK na íris isolada de porco	61
4.12 Estudo dos neuropeptídeos sobre as respostas contráteis induzidas pela des-Arg ⁹ -BK na íris isolada de porco	62
4.13 Análise dos possíveis mecanismos envolvidos na indução do receptor B ₁ na íris de porco <i>in vitro</i> após incubação com LPS	63
4.14 Análise do possível envolvimento das MAPKs na indução do receptor B ₁ na íris de porco <i>in vitro</i> após incubação com LPS	66
4.15 Ativação das MAPKs após a incubação com LPS na íris isolada de porco	67
 5 DISCUSSÃO	 69
5.1 ANÁLISE DAS RESPOSTAS CONTRÁTEIS INDUZIDAS PELA BK NA ÍRIS ISOLADA DE PORCO.....	69
5.2 Análise dos mecanismos envolvidos na resposta contrátil induzida pelo agonista seletivo para o receptor B ₁ para as cininas, a des-Arg ⁹ -BK, na íris isolada de porco	83
6. RESUMO E CONCLUSÕES	97
7. TRABALHOS PUBLICADOS.....	99
8. REFERÊNCIAS	100

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Curvas concentração-resposta cumulativas obtidas para a BK, Met-Lys-BK, Lys-BK e para a des-Arg ⁹ -BK, na íris isolada de porco.....	45
Figura 2 – Curvas concentração-resposta cumulativas obtidas para a BK na íris isolada de porco, na ausência e na presença do HOE 140, FR173657 e des-Arg ⁹ -[Leu ⁸]-BK.....	46
Figura 3 – Curvas concentração-resposta cumulativas obtidas para BK, na íris isolada de porco, na ausência e na presença de indometacina, ibuprofeno, valeril salicilato, NS398, dazoxiben e MK571.....	47
Figura 4 – Curvas concentração-resposta cumulativas obtidas para a BK, na íris isolada de porco, na ausência e na presença de KT5720, GF109203X.....	48
Figura 5 – Curvas concentração resposta cumulativas obtidas para a BK, na íris isolada de porco, na ausência e na presença do meio sem cálcio, nicardipina, w-conotoxin GVIA, w-conotoxin MVIIA (0,1µM), w-agatoxin IVA.....	50
Figura 6 – Curvas concentração-resposta cumulativas obtidas para a BK, na íris isolada de porco, na ausência e na presença da atropina, guanitidina e TTX	51
Figura 7 – Curvas concentração-resposta cumulativas obtidas para a BK, na íris isolada de porco, na ausência e na presença do FK888, SR48968, SR 142801, CGRP (8-37)	53
Figura 8 – Curvas concentração-resposta cumulativas obtidas para a BK, na íris isolada de porco, na ausência e na presença de capsaicina, capsazepina.	54

Figura 9 – Curvas concentração-resposta cumulativas obtidas para as cininas, na presença do LPS na íris isolada de porco, des-Arg ⁹ -BK, em diferentes intervalos de tempo, após a adição de LPS, Lys-des-Arg ⁹ -BK e BK, na ausência e na presença do LPS.....	56
Figura 10 – Curvas concentração-resposta cumulativas obtidas para a des-Arg ⁹ -BK, na íris isolada de porco, na ausência e na presença da des-Arg ⁹ -Leu ⁸ -BK, R-715, BZ-1, HOE 140.....	57
Figura 11 – Curvas concentração-resposta cumulativas obtidas para a des-Arg ⁹ -BK, na íris isolada de porco, na ausência e na presença do SC-560, NS 398, dazoxiben, MK 571.....	59
Figura 12 – Curvas concentração-resposta cumulativas obtidas para a des-Arg ⁹ -BK na íris isolada de porco, na ausência e na presença do GF109203X, LY294002, SB20358, PD98059.....	60
Figura 13 – Curvas concentração-resposta cumulativas obtidas para a des-Arg ⁹ -BK, na íris isolada de porco, na ausência e na presença do cálcio, nicardipina, ω -conotoxin GVIA, ω -conotoxin MVIIA.....	62
Figura 14 – Curvas concentração-resposta cumulativas obtidas para a des-Arg ⁹ -BK na íris isolada de porco, na ausência e na presença do FK888, SR48968, SR142801 e CGRP (8-37).....	63
Figura 15 – Curvas concentração-resposta cumulativas obtidas para des-Arg ⁹ -BK, na íris isolada de porco, na ausência e na presença de cicloheximida, actinomicin e dexametasona.....	64
Figura 16 – Curvas concentração-resposta cumulativas obtidas para o carbacol, na íris isolada de porco, na ausência e na presença de cicloheximida, actinomicin e dexametasona.....	64

Figura 17 – Curva concentração-resposta cumulativa obtida para a des-Arg ⁹ -BK e carbacol, na íris isolada de porco, na ausência e na presença do PDTC..	65
Figura 18 – Curvas concentração-resposta cumulativas obtidas para des-Arg ⁹ -BK, na íris isolada de porco, na ausência e na presença do LY294002, SB203580, PD98059.....	66
Figura 19 – Curvas concentração-resposta cumulativas obtidas para des-Arg ⁹ -BK, na íris isolada de porco, na ausência e na presença do LY294002, SB203580, PD98059.....	67
Figura 20 – Decurso temporal para ativação da p38 MAPK após o isolamento e incubação <i>in vitro</i> do LPS, na íris isolada de porco.....	68
Figura 21 – Decurso temporal para ativação da ERK após o isolamento e incubação <i>in vitro</i> do LPS na íris isolada de porco.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS

μM	– micromolar
BK	– bradicinina
CCR	– curvas concentração-resposta
CE_{50}	– concentração efetiva de 50%
CGRP	– peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COX	– ciclooxigenase
ERK	– proteína quinase regulada por sinal extracelular
I κ B	– proteína inibitória do N κ -KB
IL	– interleucina
IM	– inibição máxima
KCl	– cloreto de potássio
LOX	– lipooxigenase
LPS	– lipopolissacarídeo
MAPK	– proteína quinase ativada por mitógeno
NF- κ B	– fator nuclear – κ B
NK ₁	– receptor K ₁ para as neurocininas
NK ₂	– receptor k ₂ para as neurocininas
NK ₃	– receptor K ₃ para as neurocininas
nM	– nanomolar
PKA	– proteína quinase A
PKC	– proteína quinase C
SP	– substância P
TLRs	– receptores de <i>toll like</i>
TNF	– fator de necrose tumoral
TTX	– tetrodotoxina
TXA ₂	– tromboxano A ₂

1 INTRODUÇÃO

1.1 ÍRIS – ANATOMIA E FISIOLOGIA

O globo ocular funciona como receptor externo do aparelho visual e está alojado em uma cavidade óssea denominada órbita, sendo formado por três camadas distintas: externa ou esclerótica, média ou coróide e interna ou retina. A camada média contribui para a formação da íris, que é a parte pigmentada do olho. A íris situa-se no segmento anterior do olho, atrás da córnea, e apresenta forma circular, com um orifício central, a pupila. Os raios luminosos que atingem a retina penetram pela pupila, cuja abertura é regulada por movimentos da musculatura lisa da íris. Existem dois músculos antagônicos nesse tecido, o esfíncter e o dilatador, cujas contrações são reguladas pelo sistema nervoso autônomo (McMENAMIN e STEPTOE, 1991).

Os músculos são divididos em três tipos: esquelético, cardíaco e liso. Os músculos esquelético e cardíaco têm estriações transversais, porém, o esquelético não se contrai na ausência de estimulação nervosa e o cardíaco contrai-se ritmicamente, mesmo quando desnervado. Já o músculo liso, encontrado na maioria das vísceras ocas, apresenta contração semi-rítmica e anatomicamente se distingue dos demais músculos pelo fato de não ter estriações transversais visíveis (TRYBUS, 1991; BERRIDGE, 1993).

O músculo liso pode ser dividido em músculo liso visceral e músculo liso de multiunidades. No músculo liso visceral, as membranas de duas células adjacentes fundem-se para formar uma membrana única. Esse músculo é encontrado principalmente nas paredes das vísceras ocas, como, por exemplo, a musculatura

intestinal, o útero e os ureteres (OWENS, 1995). O músculo liso de multiunidades é formado por unidades individuais, sem pontes intercomunicantes, e normalmente não está sob o domínio voluntário. Além disso, esse músculo é muito sensível a substâncias químicas circulantes e, normalmente, é ativado pelos mediadores químicos, incluindo a acetilcolina e a noradrenalina, liberados das terminações dos seus nervos motores. O músculo liso é também encontrado no sistema visual e, de forma específica, na íris, onde permite que essa estrutura do globo ocular realize sua principal função, que é a contração (SOMLYO e SOMLYO, 1994; CLARK e YORIO, 2003).

A íris tem rica vascularização e inervação, e nela encontra-se o músculo esfíncter que forma o anel da pupila, sendo separado da camada posterior por uma fina camada de tecido conjuntivo frouxo. Já as fibras do músculo dilatador da pupila originam-se a partir da camada anterior do epitélio pigmentar da íris e orientam-se radialmente, sendo também envoltas por tecido conjuntivo frouxo e localizando-se posteriormente ao músculo esfíncter da pupila (NAU-STAUDT *et al.*, 2001).

A pupila tem basicamente três funções ópticas principais: regular a quantidade de luz que chega à retina; diminuir as aberrações cromáticas e esféricas produzidas pela periferia da córnea e do cristalino; e aumentar a profundidade de foco. O diâmetro da pupila é controlado pelo balanço entre as ações do esfíncter da pupila – com suas fibras de arranjo circular, cuja contração o diminui – e o dilatador da pupila, com suas fibras radiais, cuja contração o aumenta (WOODHOUSE, 1975).

O controle do diâmetro pupilar é decorrente da ação do sistema parassimpático – sendo seu principal mediador a acetilcolina, que atua principalmente sobre o esfíncter da pupila – e do sistema simpático, que age principalmente sobre o dilatador da pupila, mediante a liberação de noradrenalina. O

esfíncter da pupila recebe inervação colinérgica a partir do mesencéfalo, pelo III par de nervos cranianos. A acetilcolina liberada nas fendas sinápticas exerce seu efeito por meio de receptores específicos, sendo metabolizada pela ação da acetilcolinesterase. Muitas drogas utilizadas na prática oftalmológica, dentre elas a atropina e a tropicamida, antagonizam a ação desse mediador, levando à dilatação da pupila. Estudos farmacológicos têm demonstrado a existência de subtipos distintos de receptores muscarínicos no sistema ocular (BONER *et al.*, 1987), sendo que o tipo de receptor envolvido na resposta colinérgica do esfíncter da pupila pode variar entre as espécies estudadas. Trabalhos realizados tanto *in vivo* quanto *in vitro* com o esfíncter da íris de rato e de coelho demonstraram a presença predominante do receptor muscarínico do tipo M₃ (AKHTAR *et al.*, 1987; HAGAN *et al.*, 1988). Além disso, encontrou-se um número significativo de receptores muscarínicos do tipo M₃ na íris humana, contudo, foi também indicada a existência dos outros quatro subtipos desse receptor no sistema ocular (GIL *et al.*, 1997).

Por muito tempo, acreditou-se que as fibras do músculo dilatador da pupila de humanos recebessem inervação aferente apenas do sistema simpático, com isso, sua ação fisiológica seria decorrente da ação da noradrenalina liberada nas fendas sinápticas, levando à midríase pupilar. No entanto, ao contrário do que se pensava, o músculo dilatador da pupila também recebe inervação colinérgica, como foi observado em ratos. O estímulo de receptores muscarínicos induz o relaxamento do dilatador da pupila, tendo assim um efeito somatório à ação exercida pelo sistema parassimpático sobre o esfíncter, durante a miose (MASUDA *et al.*, 1995).

A contração pupilar pode ainda ocorrer em resposta aos estímulos gerados por objetos que estão próximos, via mecanismos ainda não bem compreendidos, o que constitui a tríade: miose, acomodação e convergência. As fibras musculares da

íris são do tipo unidades múltiplas, e cada fibra opera independentemente da outra, sendo esse controle normalmente relacionado a estímulos nervosos, diferentemente do que ocorre, por exemplo, com as fibras da musculatura lisa visceral, que são agregadas e cuja força gerada por uma célula pode ser transmitida para as outras (MORGAN e PROSKE, 1984).

A célula muscular da íris, a exemplo de outros músculos lisos, contém actina e miosina, sendo o processo contrátil ativado pelos íons cálcio que ativam a miosina-quinase, uma enzima intracelular que fosforila a miosina, levando à contração muscular. Nesse processo, é utilizada a energia gerada pela transformação da adenosina trifosfato (ATP) em adenosina difosfato (ADP). O metabolismo intracelular do cálcio é bastante complexo, contando com a participação de uma série de enzimas citoplasmáticas, dentre elas, a calmodulina, que exerce importante função no controle do cálcio intracelular (DUNLAP *et al.*, 1995; GREENBERG, 1997; HUGUERNARD, 1998).

Apesar dos aspectos pouco esclarecidos no que tange à compreensão dos mecanismos intracelulares envolvidos na resposta contrátil da íris, nos últimos anos, vários trabalhos demonstraram que outros mediadores podem estar envolvidos nessa resposta contrátil. Alguns estudos têm sido realizados com a finalidade de investigar o papel da resposta não-adrenérgica e não-colinérgica na íris de várias espécies animais, bem como de conhecer os principais neurotransmissores envolvidos nesse processo. Dentre as substâncias estudadas, podem-se destacar as cininas e as taquicininas, que são capazes de causar contração no músculo esfíncter da íris de coelho, rato e também de porco (BINKE *et al.*, 1983; UEDA *et al.*, 1984; GEPPETTI *et al.*, 1990; EVERTT *et al.*, 1992; HALL *et al.*, 1992, 1993; GRUMANN-JUNIOR *et al.*, 2000).

1.2 HISTÓRICO DO SISTEMA CALICREÍNAS-CININAS

A bradicinina (BK) e os peptídeos a ela relacionados fazem parte de uma família de moléculas denominadas cininas e são conhecidos como mediadores de respostas fisiológicas e patológicas importantes, incluindo a ativação e sensibilização de fibras aferentes sensoriais do tipo A δ e C, além de formação de edema, em consequência do aumento da permeabilidade vascular. Suas ações parecem contribuir para o desenvolvimento do choque observados na pancreatite, na sepse e na coagulação intravascular (REGOLI e BARABÉ, 1980; DENDORFER *et al.*, 1999, CALIXTO *et al.*, 2000).

Ademais, as cininas também são capazes de controlar o tônus de vários tipos de musculatura lisa, interferindo no transporte de glicose, além de estimular a reabsorção óssea e a proliferação celular (BHOOLA *et al.*, 1992). A BK também induz grande número de eventos secundários, incluindo a liberação de histamina, prostaglandinas, óxido nítrico, taquicininas e outros agentes inflamatórios (WALKER *et al.*, 1995; TAIWO e LEVINE, 1998). A estimulação de fibras sensoriais e simpáticas pela BK leva à liberação de neuropeptídeos, prostanóides e transmissores simpáticos que sensibilizam nociceptores (HALL *et al.*, 1995; WALKER *et al.*, 1995).

Os primeiros registros sobre a existência das cininas datam de 1909, quando Abelous e Bardier (1909) descreveram que a injeção endovenosa de uma fração da urina humana insolúvel em álcool produzia queda transitória da pressão em cães, sendo esse fenômeno confirmado por Frey, em 1926, em diversas espécies de animais. Posteriormente, Kraut e colaboradores (1930) caracterizaram a substância

e descreveram-na como um hormônio circulante encontrado principalmente no pâncreas. Essa substância foi denominada caliceína (do grego: *Kallikreas* para pâncreas). Entretanto, somente em 1937, Werle e colaboradores observaram que a caliceína, quando incubada no plasma, liberava uma potente substância estimuladora do músculo liso, a qual não era produto da quebra da caliceína, mas sim da quebra de uma proteína plasmática. Os mesmos autores concluíram que esse produto farmacologicamente ativo era liberado a partir de um precursor, mediante a ação proteolítica da enzima caliceína, e o denominaram calidina.

Em 1949, Rocha, Silva e colaboradores observaram que a incubação do veneno da serpente *Bothrops jararaca* ou de tripsina, com a fração pseudoglobulina do plasma, causava a liberação de um robusto agente hipotensor e contracturante. O novo fator foi definido como um polipeptídeo produzido por ação enzimática, a partir de proteínas plasmáticas. Essa substância causava contração lenta em relação à histamina e à acetilcolina no íleo de cobaia. Baseados nesses resultados, esses autores sugeriram o nome de bradicinina, palavra derivada do grego (*kinin*, que significa movimento; e *brady*, lento). Além disso, outros estudos haviam observado que a BK e a calidina ou Lys-BK (Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) eram formadas em condições similares e apresentavam as mesmas ações fisiológicas e farmacológicas, sugerindo que ambas estavam altamente relacionadas e derivavam do mesmo substrato (BERALDO e ANDRADE, 1997). A confirmação dessa hipótese aconteceu alguns anos mais tarde, quando Boissonas e colaboradores (1961) determinaram a seqüência correta de aminoácidos para a BK e sintetizaram o nonapeptídeo: (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg).

Com o advento da BK sintética, iniciaram-se os primeiros estudos para a caracterização das ações biológicas desse peptídeo. Durante as duas décadas

seguintes, os esforços científicos concentraram-se em determinar os efeitos fisiológicos da BK e seus análogos. Em 1964, Lewis demonstrou a capacidade das cininas de evocar os sinais clássicos da inflamação: edema, hiperemia e dor. Outros estudos subseqüentes demonstraram que as ações das cininas são mediadas pela ativação de receptores específicos presentes na membrana celular e denominados B₁ e B₂. Essa classificação foi proposta por Regoli e Barabé (1980), com base na determinação da ordem de potência dos agonistas em diversos tecidos isolados.

1.3 VIAS DE SÍNTESE E DEGRADAÇÃO DAS CININAS

As cininas não são estocadas na sua forma ativa como os neurotransmissores clássicos, mas se originam fisiologicamente, a partir de grandes moléculas precursoras, os cininogênios, dos quais são liberadas por proteólise (REGOLI e BARABÉ, 1980; PROUD e KAPLAN, 1988; HALL, 1992; RAIDOO e BHOOLA, 1998; MAHABEER e BHOOLA, 2000). O cininogênio de alto peso molecular (120 Kda) é uma proteína plasmática e funciona como precursor da BK. Por outro lado, o cininogênio de baixo peso molecular (66 Kda) é o precursor da calidina, embora também possa originar a BK, estando amplamente distribuído em tecidos, fibroblastos e outras estruturas celulares do tecido conectivo. Um terceiro tipo, o T-cininogênio, é equivalente ao cininogênio de alto peso molecular, mas é encontrado unicamente em ratos (BHOOLA *et al.*, 1992; McLEAN *et al.*, 2000).

Os cininogênios são clivados por um grupo de proteases conhecidas genericamente por cininogenases, as quais podem ser encontradas no sangue (calicreína plasmática) ou na maioria das glândulas exócrinas (calicreína tecidual). A calicreína plasmática é sintetizada no fígado e circula na corrente sangüínea em

uma forma inativa, denominada pré-caliceína – fator Fletcher. A pré-caliceína é rapidamente convertida em caliceína, por um processo dependente da ativação do fator XII da coagulação sangüínea – fator de Hagemann (BATHON e PROUD, 1991; BHOOLA *et al.*, 1992). A caliceína plasmática gera BK a partir do cininogênio de alto peso molecular, processo que se observa durante as respostas inflamatórias.

Por outro lado, a caliceína tecidual age sobre os cininogênios de baixo peso molecular, produzindo principalmente calidina (WERLE *et al.*, 1961; MACDONALD *et al.*, 1988). A ativação dessa caliceína ocorre após lesão tecidual, infecção ou inflamação. Além disso, independentemente desse sistema, proteases celulares liberadas de mastócitos e de basófilos durante a inflamação aguda também estimulam a formação de cininas (PROUD *et al.*, 1985; PROUD e KAPLAN, 1988; HALL, 1992; LINZ *et al.*, 1995, PROUD, 1998; RAIDOO e BHOOLA, 1998).

Aparentemente, todos os tecidos e fluidos biológicos contêm enzimas que são capazes de degradar as cininas. Dentre as várias enzimas, as cininases parecem ser as peptidases mais importantes na regulação desses mediadores. As principais cininases são: (1) a cininase I, representada pela carboxipeptidase M e N, que são capazes de remover a arginina do terminal carboxílico, formando a des-Arg⁹-BK e a des-Arg¹⁰-calidina; (2) a cininase II, uma dipeptidil carboxipeptidase, também conhecida como enzima conversora da angiotensina (ECA), que remove o dipeptídeo Phe-Arg do terminal carboxílico, causando inativação das cininas; e (3) as endopeptidases neutras, sendo a mais importante delas a encefalinase, que apresenta a mesma atividade da ECA. Para revisão, ler Proud e Kaplan (1988), Hall (1992), Linz *et al.* (1995) e Proud (1998).

1.4 RECEPTORES PARA AS CININAS

A maioria das ações das cininas é mediada pela ativação de dois subtipos de receptores específicos, denominados B_1 e B_2 . Esses receptores foram caracterizados, inicialmente, com base nos critérios farmacológicos de ordem de potência com o emprego de agonistas em órgão isolado (REGOLI e BARABÉ, 1980). Mais recentemente, ambos os receptores para as cininas foram clonados em várias espécies animais, inclusive em humanos, confirmando assim a existência dos receptores B_1 e B_2 como produtos de genes distintos (HESS, 1997). Para revisão, ler Marceau e Bachvarov (1998), Calixto *et al.* (2000 e 2001) e Calixto *et al.* (2004).

Os receptores para as cininas pertencem à superfamília de receptores acoplados a proteínas G, também chamados receptores com sete domínios transmembrana, uma vez que suas cadeias de aminoácidos atravessam a membrana celular sete vezes (McEACHERN *et al.*, 1991; HESS *et al.*, 1992; MENKE *et al.*, 1994; BACHVAROV *et al.*, 1995; MACNEIL *et al.*, 1995; PESQUERO *et al.*, 1996). Apesar de os dois tipos de receptores encontrarem-se acoplados aos mesmos mecanismos transduccionais, os receptores B_1 e B_2 têm apenas 36% de homologia na seqüência de aminoácidos, sendo essa homologia mais evidente nas sete regiões transmembrana (MARCEAU *et al.*, 1997; HESS *et al.*, 2001).

Os receptores para as cininas possuem três alças extracelulares e quatro alças intracelulares. As alças intracelulares apresentam pouca homologia, apesar de os dois tipos encontrarem-se acoplados ao mesmo tipo de proteína $G_{\alpha i}$ e $G_{\alpha q}$ (AUSTIN *et al.*, 1997; HESS *et al.*, 2001; PRADO *et al.*, 2002), e a sua ativação pode estar relacionada à estimulação direta ou indireta de diversas vias de sinalização

intracelular. Essas vias incluem: fosfolipase C e D, aumento do cálcio intracelular, ativação de isoformas específicas da proteína quinase A e C, transporte de íons cloreto, formação de óxido nítrico, aumento expressivo dos níveis de prostanóides em resposta à ativação da fosfolipase A₂ ou, ainda, ativação da via das MAP-quinases (SCHANSTRA *et al.*, 1999; LIEBMANN e BÖHMER, 2000; LIEBMANN, 2001; GABRA *et al.*, 2003).

Outros trabalhos demonstraram que a ativação dos receptores B₁ e B₂ pode resultar na estimulação de outros grupos de quinases, incluindo: tirosina-quinase, fosfatidilinositol-3-quinase e esfingosina-6-quinase (LIEBMANN e BÖHMER, 2000; BLAUKAT e DIKIC, 2001; LIEBMANN, 2001). Além disso, já foi demonstrado que pelo menos parte dos efeitos das cininas não resulta da interação com seus receptores, mas de sua capacidade de interagir diretamente com mastócitos, liberando histamina e serotonina (5-hidroxitriptamina), por uma ação independente da ativação de receptores (HALL e MORTON, 1997).

1.4.1 Estudos com Antagonistas e Radioligantes

O envolvimento dos receptores para as cininas em diferentes patologias, bem como seus efeitos fisiológicos, foi amplamente demonstrado com a utilização de ferramentas farmacológicas importantes: os antagonistas seletivos. Grandes esforços têm sido feitos na procura de um antagonista das cininas com potencial terapêutico, principalmente como antiinflamatório e analgésico. A estrutura dos primeiros antagonistas seletivos e competitivos para os receptores B₂ baseava-se no protótipo [D-Phe7]-BK (VAVREK e STUART, 1985). A segunda geração de antagonistas peptídicos para os receptores B₂ é bastante seletiva e apresenta ação

mais prolongada *in vivo*, mas sua utilização é bastante limitada, uma vez que essas drogas apresentam baixa atividade por via oral (CALIXTO *et al.*, 2000). O principal representante desse grupo é um antagonista de alta afinidade, o D-Arg-[Hip³,Ti⁵,D-Tic⁷,Oic⁸]-BK (HOE 140, icatibant) (HOCK *et al.*, 1991).

Recentemente, foram descritos antagonistas B₂ de terceira geração, que são compostos de origem não-peptídica, como o WIN 64338, que, por serem ativados por via oral, constituem um passo importante na utilização clínica dessa nova classe de drogas (SALVINO *et al.*, 1993). Outros antagonistas não-peptídicos e também seletivos para os receptores B₂, incluindo o FR173657, FR167344 e o bradizide, mostraram-se bastante efetivos em bloquear a resposta inflamatória induzida pela BK em diferentes espécies animais (revisado por HALL, 1995; MARCEAU e BACHVAROV, 1998; CALIXTO *et al.*, 2000; BURGESS *et al.*, 2000; GRIESBACHER e LEGAT, 2000).

O critério mais importante para definir a existência dos receptores B₁ foi o desenvolvimento de antagonistas seletivos com o protótipo [Leu⁸]-des-Arg⁹-BK (REGOLI *et al.*, 1977; REGOLI e BARABÉ, 1980). Mais recentemente, a modificação na estrutura dos antagonistas peptídicos para o receptor B₂ forneceu dois potentes antagonistas seletivos para os receptores B₁: o D-Arg-[Hip³, Thi⁵, D-Tic⁵, Oic⁸, des-Arg⁹]-BK ([des-Arg¹⁰]-HOE140) e o des-Arg⁹-NPC17731 (STEWART *et al.*, 1999). Outros avanços na área do desenvolvimento de bloqueadores dos receptores cininérgicos são representados pelos antagonistas seletivos dos receptores B₁, o R715, R954, B9858 e o B9958, bem como de antagonistas mistos B₁/B₂, como o B9430 (REGOLI *et al.*, 1998). Recentemente, foram descritos alguns antagonistas não-peptídicos para os receptores B₁ das cininas que são antagonistas benzodiazepínicos, a dihidroquinoxalinone e o SSR240612 (WOOD *et al.*, 2003; SU

et al., 2003; GOUGAT *et al.*, 2004; Calixto *et al.*, 2004). A utilização desses antagonistas é de importância fundamental para confirmar o papel fisiopatológico desses receptores.

1.4.2 Clonagem e Seqüenciamento

Os estudos em biologia molecular com os receptores para as cininas iniciaram em 1991, com a clonagem do receptor B₂, a partir do DNA complementar (DNAC) obtido do útero de ratas. Posteriormente, o receptor B₂ foi clonado e seqüenciado, a partir do DNAC de fibroblastos de pulmão humano (HESS *et al.*, 1992). Os autores reportaram que o DNAC para o receptor B₂ humano codifica uma proteína de 364 aminoácidos, com 81% de homologia, em relação ao receptor B₂ de rato. O gene que codifica o receptor B₂ humano consiste em três éxons separados por dois íntrons e foi mapeado no cromossomo 14q32 (POWELL *et al.*, 1993, MA *et al.*, 1994a; KAMMERER *et al.*, 1995). Mais tarde, o gene para o receptor B₂ foi também clonado em camundongos (MA *et al.*, 1994b), codificando uma seqüência de 366 aminoácidos; em coelhos (BACHVAROV *et al.*, 1995), com uma análise comparativa da seqüência de 367 aminoácidos; e em cães (HESS *et al.*, 2001), com uma seqüência de 392 aminoácidos. A análise comparativa das seqüências de aminoácidos demonstrou uma similaridade de 80% entre as espécies estudadas. A clonagem do receptor B₂ permitiu ainda identificar vários sítios de importância funcional em todas as espécies de mamíferos estudadas. Esses pontos incluem três sítios de N-glicosilação, um sítio de palmitoilação e vários sítios de fosforilação (BLAIS *et al.*, 2000).

O receptor B₁ de humanos foi clonado apenas em 1994 (MENKE *et al.*, 1994). O estudo da estrutura B₁ e da organização genômica do receptor B₁ de humanos mostrou que esse receptor contém três éxons separados por dois íntrons e está localizado em um sítio muito próximo ao do receptor B₂, no cromossomo 14q32 (BACHVAROV *et al.*, 1996; YANG e POLGAR, 1996). Posteriormente, o receptor B₁ também foi clonado em coelhos (MACNEIL *et al.*, 1995), camundongos (PESQUERO *et al.*, 1996), ratos (NI *et al.*, 1998a) e, recentemente, no cão (HESS *et al.*, 2001) e em macacos (HESS *et al.*, 2002). As espécies estudadas demonstraram homologia de 69 a 97% na seqüência de aminoácidos (PRADO *et al.*, 2002).

A partir dos estudos de clonagem e de seqüenciamento desses receptores, tornou-se possível utilizar a tecnologia de deleção gênica. O desenvolvimento de uma linhagem de camundongos, na qual o gene responsável pela expressão do receptor B₂ foi deletado, permitiu confirmar o importante papel exercido pelos receptores B₂ em fenômenos como inflamação, dor, contração e relaxamento da musculatura lisa, além da sua participação no controle da pressão arterial (BORKOWSKI *et al.*, 1995; BOYCE *et al.*, 1996). Por outro lado, demonstrou-se, por meio da geração de camundongos com deleção do gene para o receptor B₁, que esses receptores são fundamentais, tanto para a sensibilização central dolorosa quanto para o desenvolvimento de respostas inflamatórias (PESQUERO *et al.*, 2000; ARAÚJO *et al.*, 2001). Além disso, a apoptose de neutrófilos e a hipotensão induzida por LPS são reduzidas nesses animais, o que confirma a importância dos receptores B₁ nesses processos (PESQUERO *et al.*, 2000).

1.4.3 Padrão de Expressão

A principal diferença entre os receptores B_1 e B_2 está relacionada ao padrão de expressão dessas duas proteínas. Tem sido amplamente demonstrado que a maior parte das ações fisiológicas das cininas são mediadas pela ativação dos receptores B_2 , enquanto os receptores B_1 são responsáveis por amplificar e perpetuar a sinalização iniciada pela estimulação dos receptores B_2 . As respostas mediadas pela ativação de ambos os receptores são qualitativamente similares e geralmente envolvem a ativação dos mesmos tipos celulares (MARCEAU *et al.*, 1998; CALIXTO *et al.*, 2000; CALIXTO *et al.*, 2004). Dessa maneira, os receptores B_2 são expressos de forma constitutiva em vários órgãos, tecidos e tipos celulares, incluindo: células endoteliais, fibroblastos, epitélio glandular, rins, coração, musculatura esquelética, sistema nervoso central, musculatura lisa e de vasos sanguíneos, ducto deferente, traquéia, intestino, útero e bexiga (DENDORFER *et al.*, 1999).

Por outro lado, um grande número de evidências indica que os receptores B_1 estão geralmente ausentes em tecidos de animais em condições normais, sendo rapidamente induzidos e modulados em diversos tipos celulares após longos períodos de incubação *in vitro*, após trauma tecidual ou infecções ou, ainda, após o tratamento com endotoxinas bacterianas, adjuvante de Freud, citocinas pró-inflamatórias, luz ultravioleta e estresse térmico, dentre outros (MARCEAU *et al.*, 1998; AHLUWALIA e PERRETTI, 1999; CALIXTO *et al.*, 2000; CALIXTO *et al.*, 2004).

1.4.4 Indução do Receptor B₁

A importância fisiopatológica do fenômeno de indução dos receptores B₁ tem sido amplamente estudada em vários modelos *in vitro* e *in vivo*. A indução dos receptores B₁ pode ser facilmente observada na maioria das preparações *in vitro* obtidas de coelhos, ratos, suínos e também de humanos (MARCEAU *et al.*, 1998). Essas preparações normalmente não respondem aos agonistas do receptor B₁ na primeira hora de incubação *in vitro*. O fenômeno de indução do receptor B₁ parece depender da síntese *de novo* de proteínas, uma vez que é completamente bloqueado em tecidos tratados com inibidores de transcrição de RNA e de tradução ou maturação protéica (MARCEAU *et al.*, 1980; WHALLEY *et al.*, 1983; AUDET *et al.*, 1994; CAMPOS e CALIXTO, 1994; HADDAD *et al.*, 2000; SARDI *et al.*, 2000).

Além disso, outros estudos *in vitro* mostram que certas citocinas e fatores de crescimento amplificam a resposta mediada pelos receptores B₁, em consequência do isolamento e da incubação do tecido (BOUTHILLIER *et al.*, 1987; DEBLOIS *et al.*, 1991; LEVESQUE *et al.*, 1995; McLEAN *et al.*, 1999). Agentes que estimulam a síntese das citocinas, como LPS, também levam à expressão do receptor B₁ quando administrados tanto *in vivo* quanto *in vitro* (REGOLI *et al.*, 1981; DEBLOIS *et al.*, 1989; MARCEAU *et al.*, 1998; McLEAN *et al.*, 1999; PASSOS *et al.*, 2004; CALIXTO *et al.*, 2004).

A indução funcional das respostas mediadas pelo receptor B₁ está associada ao aumento do seu RNAm e à expressão da proteína (MARCEAU *et al.*, 1998; McLEAN *et al.*, 2000). Alguns estudos têm sugerido que o fenômeno de indução do receptor B₁ envolve a ativação de fatores transcricionais, incluindo o fator nuclear NF-κB. É reconhecido que estímulos como citocinas pró-inflamatórias ou LPS

induzam a fosforilação do inibidor endógeno I κ B, promovendo a ativação do NF- κ B, modulando a síntese *de novo* dos receptores B₁ (CALIXTO *et al.*, 2000; FERNANDES *et al.*, 2003; PASSOS *et al.*, 2004). Essas evidências são confirmadas por dados recentes, que mostram a ocorrência de sítios de ligação para diversos fatores de transcrição, como AP-1, CREB e NF- κ B, na região promotora do gene do receptor B₁ (NI *et al.*, 1998b). Outros dados da literatura demonstram a participação do NF- κ B no aumento das respostas mediadas pelos receptores B₁ no rim (MARCEAU *et al.*, 1999) e na aorta de coelhos tratados com LPS (MEDEIROS *et al.*, 2001), bem como em patas de ratos injetadas com o fator de agregação plaquetária ou LPS (FERNANDES *et al.*, 2003; PASSOS *et al.*, 2004).

A identificação da seqüência que constitui a região promotora do gene do receptor B₁ é considerada de grande importância para os estudos relacionados ao controle da expressão desse receptor *in vivo* e *in vitro* (CHAI *et al.*, 1996; YANG *et al.*, 1998; NI *et al.*, 1998a). Essa descoberta comprova sua alta susceptibilidade de regulação por mais de um mecanismo ou fator de transcrição. Além disso, outros elementos regulatórios podem existir fora das regiões examinadas (MARCEAU *et al.*, 1998). Yang e colaboradores (1998) sugeriram que diferentes estimuladores requerem diferentes tamanhos do promotor ou diferentes elementos regulatórios para induzir a transcrição do gene do receptor B₁. Estudos utilizando as técnicas de transcrição reversa seguida de reação de polimerase em cadeia (RT-PCR) e *Southern blot* mostraram a presença do gene do receptor B₁ em muitos tecidos, como glândula salivar, pâncreas, cólon, útero, ovário, cérebro, adrenais, tireóide, fígado, pulmões e próstata, dentre outros (CHAI *et al.*, 1996). Finalmente, a identificação do gene do receptor B₁, na maioria dos tecidos, demonstra a capacidade para a sua indução nos mais diferentes processos patológicos, tornando

de grande importância o desenvolvimento de novos estudos, para uma melhor caracterização e compreensão dos mecanismos envolvidos na regulação desses receptores.

1.5 PARTICIPAÇÃO DAS CININAS NO SISTEMA OCULAR

Apesar dos inúmeros estudos nesse sentido, ainda há muitas dúvidas a respeito do papel exercido pelas cininas, nos diferentes processos patológicos. Assim, são de grande importância novos estudos sobre isso, para melhor caracterização e compreensão dos mecanismos envolvidos na regulação desses receptores, bem como melhor entendimento do papel exercido por esses receptores em diferentes processos fisiopatológicos.

Estudos realizados na íris de algumas espécies animais mostram o envolvimento de neuropeptídeos liberados dos neurônios sensoriais no controle do tônus da pupila (COLE e UNGER, 1974; BUTTER e HAMMOND, 1980; HAKANSON *et al.*, 1987; GRUMANN-JUNIOR *et al.*, 2000). Entre eles, encontra-se a BK, que parece ser responsável por causar miose e inflamação. Essa ação da BK é atribuída à liberação de neuropeptídeos sensoriais das fibras sensíveis à capsaicina de origem trigeminal (COLE e UNGER, 1974; ZHANG *et al.*, 1982; WAHLESTEDT *et al.*, 1985).

Outros estudos realizados no esfíncter isolado da íris de porco demonstraram que a BK, além de contrair essa musculatura, causa liberação neuronal de substância P (GEPETTI *et al.*, 1990; HARUNO *et al.*, 1995). Além disso, os efeitos oculares causados pela BK e pela capsaicina podem ser reduzidos via tratamento com bloqueadores neuronais, como a tetrodotoxina, ou antagonistas da substância

P (BYNKE *et al.*, 1983; WANG e HAKANSON, 1993; UEDA *et al.*, 1984). Ainda, Igic (1985) demonstrou a atividade das calicreínas em diferentes estruturas do olho de porco, e os resultados mostraram alta atividade da cininase II na retina, coróide e no corpo ciliar. No entanto, a cininase I (carboxipeptidase N) foi encontrada no humor aquoso e na íris de porco.

Apesar da existência de alguns estudos nos quais foram caracterizadas as respostas das cininas, principalmente, na íris isolada de coelho (BUTLER *et al.*, 1981; UEDA *et al.*, 1984; WAHLESTEDT *et al.*, 1985), até o momento, poucos estudos foram realizados no intuito de avaliar os mecanismos farmacológicos e bioquímicos envolvidos nas respostas às cininas na íris isolada de porco. Além disso, até o momento, não há estudos na literatura que caracterizem o papel do receptor B₁ para as cininas na íris de porco. Sendo assim, é de fundamental importância avaliar os mecanismos farmacológicos e bioquímicos envolvidos nas respostas dos receptores B₁ e B₂ para as cininas, nessa espécie animal.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi analisar, mediante técnicas farmacológicas, bioquímicas e de biologia molecular, alguns dos mecanismos envolvidos nas respostas contráteis induzidas pelas cininas que atuam nos receptores B₁ e B₂ no esfíncter da íris de porco *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Mais especificamente, os objetivos foram:

- Caracterizar, por meio do uso de agonistas e antagonistas seletivos para os receptores B₁ e B₂ das cininas, os mecanismos envolvidos nas respostas contráteis da íris isolada de porco;
- Analisar, com o emprego de inibidores de enzimas e canais iônicos, os mecanismos envolvidos nas respostas contráteis induzidas pelas cininas nesse modelo; e
- Analisar o possível envolvimento do fator nuclear NF-κB e das MAPKs quinases sobre a indução do receptor B₁ na íris.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Olhos de porco de ambos os sexos foram obtidos no abatedouro de suínos Frigovale, localizado na cidade de Itajaí, em Santa Catarina. Imediatamente após a morte dos animais, os olhos foram retirados e mantidos em gelo, durante o transporte. Os tecidos foram usados no máximo em até 6 h após a morte dos animais. As íris foram rapidamente retiradas e, após separadas dos tecidos adjacentes, postas em placa de Petri contendo solução Krebs-Henseleit (ver composição abaixo).

3.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.2.1 Estudos *in vitro*

As íris foram cuidadosamente dissecadas dos tecidos aderentes e, de cada olho, foram obtidas duas preparações com aproximadamente 2 cm de comprimento por 2 mm de largura. Os esfíncteres isolados das íris foram colocadas em cubas contendo solução de Krebs-Henseleit, com a seguinte composição em mmol/l: NaCl, 118,0; KCl, 4,4; CaCl₂, 2,5; NaHCO₃, 25,0; MgSO₄, 1,1; KH₂PO₄, 1,2; e glicose, 11,0. As preparações foram mantidas a 37°C, com pH 7,4 e continuamente oxigenadas com 95% de O₂ e 5% de CO₂.

Essas preparações foram conectadas verticalmente a um transdutor de força isométrica (Letica Instruments, modelo Espanha). Previamente à realização das curvas concentração-resposta para os agonistas específicos, foi estabelecida a tensão basal ideal a ser empregada. Para tanto, utilizaram-se diferentes tensões (50 a 300 mg) no mesmo tecido. Após o período de equilíbrio de 60 min, foi adicionada ao banho uma única concentração de BK (1 nM), sob diferentes tensões. A tensão de 100 mg foi a que proporcionou a melhor resposta, passando a ser adotada em todos os experimentos subseqüentes.

Com o objetivo de estabelecer o número máximo de curvas por experimento, após estabelecida a tensão ideal, construíram-se quatro curvas concentração-resposta, por método cumulativo, na mesma preparação, com intervalo de 30 min entre uma curva e outra. Utilizando esse protocolo, não foi observada dessensibilização na responsividade do órgão à BK, estabelecendo-se o máximo de quadro curvas realizadas em uma única preparação.

As preparações permaneceram em equilíbrio por 60 min antes da adição de qualquer droga ao banho e, durante esse período, a solução nutritiva foi renovada a cada 15 min. Para confirmar a viabilidade dos tecidos, decorrido o período de equilíbrio, as preparações foram expostas a uma solução contendo uma alta concentração de potássio (KCl 80 mM, preparada por substituição equimolar de 74,4mM de NaCl por KCl no meio), como estímulo padrão. Os experimentos foram iniciados 30 min após a lavagem das preparações e a reposição com a solução de Krebs normal. Decorridos 90 min da montagem das preparações, foram realizadas curvas concentração-resposta completas, pelo método cumulativo, para o agonista seletivo do receptor B₂, a BK (0,1 – 10.000 nM), ou para o agonista B₁, a des-Arg⁹-

BK (0,1 – 10.000 nM), estabelecendo-se um período de 30 min de intervalo entre cada curva.

As respostas contráteis foram expressas como percentagem de tensão em relação à contração inicial causada pelo KCl (80 mM). Todos os experimentos para a BK foram realizados na presença de captopril (3 μ M), a fim de evitar sua degradação pela ação da cininase II. Na maioria dos casos, foram montadas seis preparações simultaneamente e, em todos os experimentos, havia sempre uma preparação que recebia apenas o agonista na presença do veículo que servia como controle.

3.2.2 Análise das respostas contráteis induzidas pelas cininas na íris isolada de porco

Como descrito anteriormente, na fase inicial dos experimentos, decorrido o período de equilíbrio, as preparações foram expostas a uma alta concentração de potássio (KCl 80 mM) após o registro das respostas e lavagens das preparações com solução de Krebs Heinseleit e o retorno à linha de base, foi obtida uma única curva concentração-resposta a um agonista para o receptor B₂ das cininas (BK, Met-Lys-BK ou Lys-BK) ou para o receptor B₁ (a des-Arg⁹-BK e a Lys-des-Arg⁹-BK), pelo método cumulativo (VAN ROSSUM, 1963). Em outra série de experimentos, com o objetivo de verificar quais subtipos de receptores estariam envolvidos nas respostas contráteis induzidas pela BK na íris isolada de porco, foram realizadas, após o período de equilíbrio, curvas concentração-resposta para a BK, na ausência ou presença de diferentes concentrações de dois antagonistas seletivos para os receptores B₂, o HOE 140 (0,1 a 3 pM) e o FR173657 (10 a 100 nM), e também para o receptor B₁, a des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK (1 μ M).

3.2.3 Análise da participação dos sistemas simpático e parassimpático nas respostas contráteis induzidas pela BK na íris isolada de porco

Para avaliar o possível envolvimento da transmissão colinérgica e noradrenérgica nas respostas contráteis induzidas pela BK nessa preparação, foram testadas diferentes drogas. Inicialmente, utilizaram-se a atropina (antagonista colinérgico, 1 μ M) e guanetidina (depletor da norepinefrina, 1 μ M), além do bloqueador de canal de sódio, a tetrodotoxina (1 μ M, TTX). Todas as drogas foram pré-incubadas com as preparações, por pelo menos 20 min, sendo posteriormente realizadas novas CCRs à BK, na presença das referidas drogas.

3.2.4 Estudo do envolvimento dos metabólitos derivados da via do ácido araquidônico nas respostas contráteis induzidas pela BK na íris isolada de porco

Com o objetivo de analisar o envolvimento dos metabólitos derivados da via do ácido araquidônico, inicialmente, as preparações foram incubadas com os inibidores não seletivos para COX-1 e 2, a indometacina (1 μ M) ou o ibuprofeno (10 μ M). Além disso, também foi utilizado o inibidor para a COX-1, o valeryl salicilato (10 μ M), ou o inibidor preferencial para a COX-2, o NS398 (10 μ M). Na seqüência dos estudos, foi verificada a participação dos leucotrienos e do tromboxano A_2 na resposta contrátil induzida pela BK na íris isolada de porco, utilizando-se o inibidor da síntese do tromboxano A_2 (dazoxiben, 100 nM) ou do leucotrieno D_4 (MK571, 100 nM). Todas as drogas foram incubadas com as preparações por 20 min, sendo

posteriormente realizadas novas curvas concentração-resposta à BK, na presença das referidas drogas.

3.2.5 Influência do cálcio extracelular e dos canais de cálcio nas respostas contráteis induzidas pela BK na íris isolada de porco

Com o objetivo de estudar a contribuição do cálcio externo para a resposta contrátil induzida pela BK na íris isolada de porco, após a obtenção de uma curva concentração-resposta cumulativa de controle à BK, em solução com Krebs normal, as preparações foram transferidas para solução sem cálcio, contendo o quelante de cálcio, o etilenoglicol-bis-(β -amino-etil éster) (EGTA 1 mM), na qual elas permaneceram por 20 min. Durante esse período, a solução nutritiva sem cálcio foi renovada a cada 5 min, sendo então realizada uma nova curva concentração-resposta à BK, em meio sem cálcio. Após a realização dessa curva, as preparações foram novamente transferidas para a solução de Krebs normal por 30 min, e uma nova curva concentração-resposta à BK foi obtida.

Para avaliar a participação de canais de cálcio dependentes de voltagem na resposta contrátil induzida pela BK na íris isolada de porco, vários inibidores de canais de cálcio foram testados em diferentes grupos de experimentos. Curvas concentração-resposta cumulativas à BK foram obtidas na ausência e na presença dos seguintes antagonistas: nicardipina (1 μ M, antagonista de canais de cálcio tipo L), ω -conotoxina GVIA e ω -conotoxina MVIIA (0,1 μ M, bloqueadores seletivos de canais de cálcio tipo N) e ω -agatoxina IVA (0,1 μ M, bloqueador de canais de cálcio tipo P), todos pré-incubados com as preparações por 20 min.

3.2.6 Participação dos neuropeptídeos nas respostas contráteis induzidas pela BK na íris isolada de porco

A participação do sistema taquicinérgico foi analisada sobre as respostas contráteis à BK, utilizando-se os inibidores seletivos dos receptores NK₁ (FK888, 100 nM), NK₂ (SR48968, 100 nM) e NK₃ (SR142801, 100 nM). Os antagonistas foram adicionados às preparações 20 min antes da realização das curvas concentração-resposta à BK. Para complementar o estudo, foi também investigada a participação do CGRP na resposta contrátil da íris, mediante o emprego do fragmento (8-37) do CGRP (1 µM, antagonista do receptor para o CGRP), pré-incubado por 20 min. Além disso, foi também avaliado o possível envolvimento dos receptores vanilóides e a influência das fibras aferentes primárias de pequeno diâmetro, especialmente do tipo C, nessa preparação. Inicialmente, utilizou-se o antagonista competitivo dos receptores vanilóides, a capsazepina (1 µM), que foi pré-incubada com as preparações por 20 min. A seguir, em outro grupo experimental, as preparações foram dessensibilizadas pela adição de uma concentração elevada de capsaicina (10 µM) por 30 min, seguida de lavagem dos tecidos. Na seqüência desse protocolo experimental, estabeleceu-se um novo período de equilíbrio de 60 min e somente após essa etapa foram novamente realizadas curvas concentração-resposta à BK na íris isolada de porco.

3.2.7 Participação das proteínas quinases na resposta contrátil induzida pela BK na íris isolada de porco

Para investigar alguns dos mecanismos intracelulares envolvidos na resposta contrátil mediada pela BK, em outro grupo de experimentos, foi analisada a participação de algumas proteínas quinases (PK) na contração induzida pela BK na íris isolada de porco. Analisaram-se os efeitos dos inibidores da proteína quinase A (PKA: KT5720, 100 nM) e da proteína quinase C (PKC: GF109203X, 1 μ M).

3.2.8 Indução *in vitro* do receptor B₁ para as cininas após incubação com LPS

Para complementar o estudo da caracterização das respostas contráteis das cininas na íris de porco, foi investigado o perfil dos receptores B₁ nessa preparação. Assim, passam-se a analisar as respostas dos agonistas seletivos para o receptor B₁, a des-Arg⁹-BK e a Lys-des-Arg⁹-BK. Decorrido o período de estabilização de 60 min, as preparações foram expostas a uma única concentração de KCl (80 mM) como estímulo padrão. No intuito de monitorar o aumento da resposta contrátil dependente do tempo mediada pela indução dos receptores B₁, após a lavagem das preparações e seu completo relaxamento, o agonista seletivo do receptor B₁ (1 μ M, concentração próxima àque causa a resposta máxima) foi adicionado ao banho 2, 4, 6, 12 e 24 h após a montagem dos tecidos.

Em outra série de experimentos, utilizando o mesmo protocolo experimental, foi adicionado às preparações o LPS (5 μ g/mL). Ao final dos experimentos (4 h após a incubação com LPS) foi adicionado carbacol (1 a 10.000 nM) às preparações,

como controle para avaliar a viabilidade do tecido, bem como a seletividade de ação dos inibidores testados *in vitro*.

3.2.9 Caracterização funcional dos mecanismos envolvidos na indução *in vitro* do receptor B₁ para as cininas após incubação com LPS

Para avaliar os possíveis mecanismos envolvidos na indução do receptor B₁ na íris de porco *in vitro*, a resposta contrátil à des-Arg⁹-BK foi obtida a partir de tecidos incubados continuamente por 4 h, com LPS (5 µg/mL), na ausência (controle) ou presença de alguns inibidores da indução do receptor B₁. Foram utilizados o inibidor da transdução cicloheximida (70 µM) e os inibidores da transcrição dexametasona (100 µM), actinomicina D (1 µM) e do NF-κB (PDTC, 300 µM). Em outra série experimental, com o objetivo de analisar a possível participação das MAPKs na indução do receptor B₁ na íris, as preparações foram expostas continuamente aos bloqueadores das MAP quinases, o PD98059 (10 µM, inibidor seletivo da MEK1, proteína quinase responsável pela ativação da ERK), LY294002 (1µM, inibidor da fosfatidilinositol 3-quinase) e o SB203580 (10 µM, inibidor da p38 MAPK). A resposta contrátil ao carbacol foi utilizada como estímulo padrão na presença dos inibidores, a fim de descartar possíveis efeitos não específicos dessas drogas.

3.2.10 Efeito dos inibidores seletivos na indução do receptor B₁ após a incubação *in vitro* de LPS

Em outro protocolo experimental, analisaram-se alguns dos mecanismos de sinalização intracelular envolvidos nas respostas contráteis induzidas pela des-Arg⁹-BK na íris isolada de porco. Para tanto, as preparações foram incubadas com LPS por 4 h e, após esse período, foram analisados os efeitos da incubação de diferentes grupos de droga na contração da des-Arg⁹-BK. Inicialmente, as preparações foram pré-incubadas com os antagonistas do receptor B₁, a des-Arg⁹-Leu⁸-BK (3 a 30 µM), R-715 (1 a 10 nM) e do composto benzodiazepínico-1 (3, 10 e 30 nM), com o objetivo de caracterizar o perfil farmacológico desse receptor na íris isolada de porco. Além disso, foi também avaliada a possível participação do receptor B₂ nesse efeito, utilizando-se o HOE 140 (30 nM). Todos esses inibidores foram pré-incubados com as preparações por 10 min, antes da obtenção de nova curva concentração-resposta à des-Arg⁹-BK.

Visando a investigar o possível envolvimento dos metabólitos derivados da via do ácido araquidônico nas respostas contráteis induzidas pela des-Arg⁹-BK, as preparações foram inicialmente pré-incubadas com LPS e depois com o agonista preferencial para a COX-1, o valeryl salicilato (10 µM), e o inibidor seletivo da COX-2 o NS398 (1 µM). Além disso, foi também verificada a participação dos leucotrienos e do tromboxano A₂ na resposta contrátil induzida pela des-Arg⁹-BK na íris isolada de porco, utilizando-se o antagonista do receptor do tromboxano A₂ (dazoxiben, 100 nM) e do leucotrieno D₄ (MK 571, 100nM). Todas as drogas foram incubadas por um período de 20 min, sendo posteriormente realizadas novas curvas concentração-resposta à des-Arg⁹-BK, na presença das referidas drogas.

Para avaliar a influência do cálcio nas respostas contráteis induzidas pela des-Arg⁹-BK na íris isolada de porco, foram construídas curvas concentração-resposta cumulativas controle para a des-Arg⁹-BK em solução com Krebs normal. A seguir, as preparações foram transferidas para solução sem cálcio, na presença de EGTA (1 mM), onde permaneceram por 20 min. Durante esse período, a solução nutritiva foi renovada a cada cinco minutos, sendo, então, construída nova curva concentração-resposta à des-Arg⁹-BK, nesse meio sem cálcio. Após a realização das curvas concentração-resposta à des-Arg⁹-BK, as preparações foram novamente transferidas para a solução de Krebs normal por 30 min e nova curva concentração-resposta à des-Arg⁹-BK foi obtida.

Ainda visando a avaliar a participação de canais de cálcio na resposta contrátil induzida pela BK na íris isolada de porco, foram construídas, em outro grupo experimental, curvas concentração-resposta cumulativas à des-Arg⁹-BK na ausência e na presença dos seguintes antagonistas: nicardipina (1 µM, antagonista de canal de cálcio tipo L), ω-conotoxina GVIA e ω-conotoxina MVIIA (0,1 µM, bloqueador seletivo de canal de cálcio tipo N), todos pré-incubados com as preparações por 20 min.

Em outro grupo experimental, foi também analisada a possível participação do sistema taquicinérgico nas respostas contráteis à des-Arg⁹-BK, usando-se os inibidores do receptor NK₁ (FK888, 100 nM), NK₂ (SR48968, 100 nM) e NK₃ (SR142801, 100 nM). Os antagonistas foram adicionados às preparações 20 min antes da realização das curvas concentração-resposta à des-Arg⁹-BK. A participação do CGRP também foi investigada, mediante o emprego do fragmento (8-37) do CGRP (1 µM, antagonista do receptor do CGRP), pré-incubado com as preparações por 20 min.

Finalmente, verificou-se o papel de algumas proteínas quinases, utilizando-se os seguintes inibidores: GF109203X (1 μ M), inibidor da PKC, o LY294002 (1 μ M), inibidor seletivo da fosfatidilinositol 3-quinase e das MAPKs p38 MAPK (SB203580, 10 μ M) e MEK-1 (PD 98059, 10 μ M). Todos os inibidores foram pré-incubados por cerca de 20 min e, após esse período, foi obtida nova curva concentração-resposta à des-Arg⁹-BK, na presença desses inibidores. Alguns tecidos receberam apenas o veículo utilizado para diluição das drogas e serviram como controle.

3.3 ESTUDOS COM TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR

3.3.1 Preparação dos tecidos

Nesta série de experimentos, os tecidos foram preparados como descrito por Sabourin e colaboradores (2002), com algumas modificações. Após o isolamento, a íris de porco foi incubada com LPS por diferentes períodos de tempo (5, 15, 30, 60, 120 e 180 min) em placas de 24 poços contendo meio para cultura de células DMEM (Gibco) sem soro, na ausência ou na presença dos inibidores das MAPKs ou do NF- κ B. As preparações foram mantidas a 37°C e continuamente gaseificadas com 95% de O₂ e 5% de CO₂. Após o período de incubação, os tecidos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Alguns tecidos foram congelados imediatamente após o procedimento de isolamento (controle basal). Os tecidos congelados foram armazenados em *freezer* a -70°C, até o momento do uso.

3.3.2 Extração de proteínas citosólicas e nucleares

Os extratos protéicos com LPS nos diferentes tempos (5, 15, 30, 60, 120 e 180 min) foram preparados como descrito por Lalenti e colaboradores (2001), com algumas modificações. Os segmentos da íris de porco foram congelados, suspensos em tampão de lise gelado (HEPES 10 mM (pH 7,9), contendo: 1,5 mM de $MgCl_2$, 10 mM de KCl, 0,5 mM de fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF), 0,5 mM de ditioneitol (DTT), 50 mM de NaF, 2 mM de Na_3VO_4 , 1,5 $\mu g/ml$ de inibidor de tripsina, 7 $\mu g/ml$ de pepstatina A, 5 $\mu g/ml$ de leupeptina e 10 $\mu g/ml$ de aprotinina) e homogeneizados em Politron por 20 s, duas vezes.

O homogenato foi centrifugado a 10000xg por 30 min e o sobrenadante foi separado como a fração citosólica das preparações. O *pellet* foi ressuspenso em tampão com alta concentração de sal (HEPES 20 mM (pH 7,9), contendo: 420 mM de NaCl, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de EDTA, 25% v/v de glicerol, 0,5 mM de PMSF, 0,5 mM de DTT, 1,5 $\mu g/ml$ de inibidor de tripsina, 7 $\mu g/ml$ de pepstatina A, 5 $\mu g/ml$ de leupeptina e 10 $\mu g/ml$ de aprotinina) e incubado sob agitação constante, a 4°C por 30 min. O homogenato foi centrifugado a 10.000xg por 30 min, sendo o sobrenadante coletado como a fração nuclear das preparações. A determinação da concentração de proteínas das amostras foi realizada utilizando-se o kit Bio-Rad para determinação de proteínas (*Bio-Rad Protein Assay Kit*), segundo recomendações do fabricante. As frações citosólica e nuclear foram armazenadas em *freezer* a -70°C, até o momento do uso.

3.3.3 Ensaaios de *Western Blot*

Com o objetivo de verificar as possíveis alterações no padrão de expressão de proteínas consideradas importantes no processo de indução do receptor B₁, após a incubação dos tecidos com LPS *in vitro* nos diferentes tempos (5, 15, 30, 60, 120 e 180 min), foi então utilizada a técnica de *western blot*. A fração citosólica foi obtida como descrito anteriormente, submetida à eletroforese em gel desnaturante, SDS-poliacrilamida (10 – 12%), sendo logo depois transferida para membrana de polivinilidenodifluorido (PVDF).

Após a transferência, a membrana foi bloqueada em solução de leite desnatado (5%) e posteriormente incubada com um dos seguintes anticorpos para as proteínas de interesse: forma total ou fosforilada para as proteínas p38 MAPK e ERK (Santa Cruz Biotechnology). A visualização das proteínas foi realizada utilizando-se anticorpo secundário específico conjugado à peroxidase e as bandas imunorreativas foram visualizadas usando-se kit de aumento de quimioluminescência (ECL, Amersham Pharmacia Biotech.) e filme radiográfico, segundo recomendações do fabricante.

3.4 DROGAS E REAGENTES

Os seguintes reagentes e drogas foram utilizados: BK, des-Arg⁹-BK, Met-Lys-BK, Lys-BK, des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK, Lys-des-Arg⁹-BK, cicloheximida, actinomicina-D, tetrodotoxina, guanitidina, ibuprofeno, carbacol, captopril, capsaicina, CGRP-(8-37), EGTA, dexametasona, indometacina, LPS (lipopolissacarídeo de bactéria *E. coli* sorotipo 0111B4, L=2630), R-715, PDTC (todos obtidos da Sigma Chemical

Company, St. Louis, EUA); capsazepina, valeril pentanoil salicilato (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA); dazoxiben (Pfizer, Kent, Reino Unido); sulfato de atropina, MK-571, benzodiazepínico-1 (E. Merck, Darmstadt, Alemanha); nicardipina (Research Biochemicals International, Natick, MA, USA); GF109203X, KT5720, LY294002 (Tocris Cookson Inc., St. Louis, MO, USA); ω -agatoxina IVA, ω -conotoxina GVIA, ω -conotoxina MVIIA (Alamone Labs, Jerusalém, Israel); NS398 (Tocris Inc., EUA); PD98059 (Research Biochemical International, RBI, MA, EUA); e HOE140 (Aventis Pharma Deutschland, Frankfurt Main, Alemanha). Os antagonistas do receptor NK₂, o SR48968, e NK₃, o SR142801, foram doados pela Sanofi Recherche (Montpellier, França). Os antagonistas do receptor NK₁, o FK888 e o FR173657 eram da Fujisawa, Pharmaceutical Co. (Osaka, Japão).

As soluções estoque para todos os peptídeos foram preparadas em PBS (1 – 10 mM), em tubos siliconizados, mantidas a -18°C e diluídas na concentração desejada no dia dos experimentos. As outras drogas foram diluídas em PBS, com exceção da dexametasona, indometacina, PDTC e LY294002, que foram diluídas em 5% de etanol. O NS-398, valeril salicilato, KT5720 e o GF109203X foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO). A concentração final de etanol ou DMSO não excedeu 0,05%. As diluições finais foram feitas em solução de Krebs-Henseleit. Em todos os grupos experimentais, foram realizados experimentos controle na presença do veículo utilizado para diluição da droga. Os veículos utilizados não tiveram qualquer efeito farmacológico sobre o tônus da preparação ou sobre a resposta induzida pelo agonista.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.), exceto as CE_{50} (concentração do agonista que produz 50% do efeito máximo em experimentos individuais), que foram apresentadas como médias geométricas acompanhadas de seus respectivos intervalos de confiança a 95%.

A análise estatística dos resultados foi realizada por meio do teste “t” de Student, não pareado ou pareado pela análise de variância ANOVA, seguida pelo teste de Dunnett, quando necessário. Os valores de P menores do que 0,05 foram considerados como indicativo de significância.

4 RESULTADOS

4.1 Análise das respostas contráteis induzidas pelas cininas na íris isolada de porco

A adição de concentrações cumulativas crescentes dos agonistas cininérgicos B₂ (BK, Met-Lys-BK e Lys-BK) (Figura 1), resultou em contração dependente da concentração da íris isolada de porco. A resposta máxima (E_{max}) produzida pela BK, quando comparada ao KCl, foi semelhante àquela observada para a Met-Lys-BK: 106 ± 4 e $103 \pm 5\%$, respectivamente. Para a Lys-BK, o E_{max} foi de $74 \pm 11\%$, sendo a menor resposta contrátil em relação aos outros agonistas do receptor B₂ estudados nessa preparação. As cininas analisadas nessa preparação tiveram a seguinte potência (CE_{50s} médias – com limite de confiança de 95%) BK 21,0 (12,0 – 47,0), Met-Lys-BK: 4,7 (1,4 – 15,0) e Lys-BK: 11,0 (6,0 – 30,0) nM. Em outros experimentos, foi analisado o efeito do agonista seletivo para o receptor B₁, a des-Arg⁹-BK (1 μM), adicionado ao banho 2, 4, 6, 12 e 24 h após a montagem das preparações. Os resultados demonstraram que não ocorreu, durante o período de tempo estudado, nenhuma resposta contrátil detectável na íris isolada de porco (Figura 1).

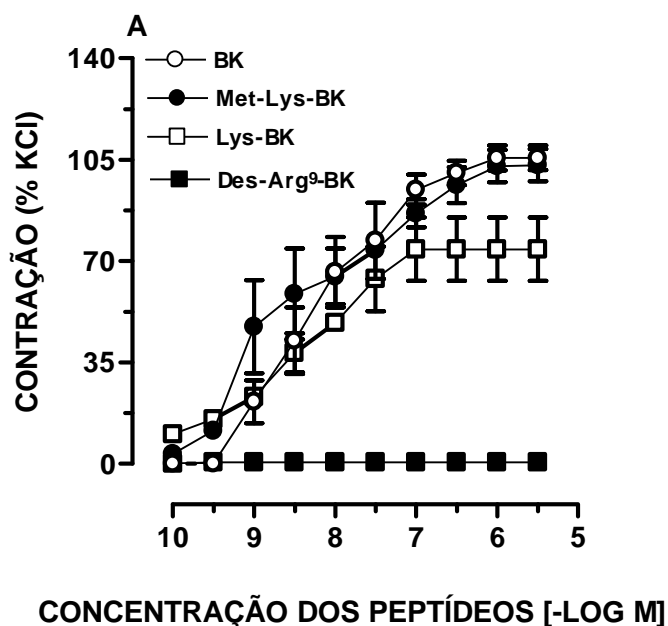


Figura 1 – Curvas concentração-resposta cumulativas obtidas após 90 min da montagem das preparações para a BK, Met-Lys-BK, Lys-BK e para a des-Arg⁹-BK na íris isolada de porco. Os resultados são expressos como percentagem da contração induzida pelo KCl (80mM). Cada ponto representa as médias e as linhas verticais os E.P.M. de cinco experimentos.

Na fase seguinte do estudo, foram caracterizados os subtipos de receptores envolvidos nas respostas contráteis induzidas pela BK na íris isolada de porco. Para analisar o perfil farmacológico dos receptores das cininas, foram utilizados os antagonistas seletivos para os receptores B₂, o HOE 140 (0,1 a 3 pM) e o FR173657, (10 a 100 nM). Os resultados da Figura 2 (A e B) mostram que tanto o HOE 140 quanto o FR173657 foram capazes de reduzir a curva concentração-resposta da BK, de maneira proporcional à concentração usada, com associado deslocamento da curva à direita, caracterizando um antagonismo do tipo não-competitivo. No entanto, quando foi testado nessa preparação o efeito do antagonista seletivo para o receptor B₁, a des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK (1 µM), os resultados demonstraram que esse antagonista não foi capaz de alterar a resposta contrátil induzida pela BK na íris isolada de porco (Figura 2C).

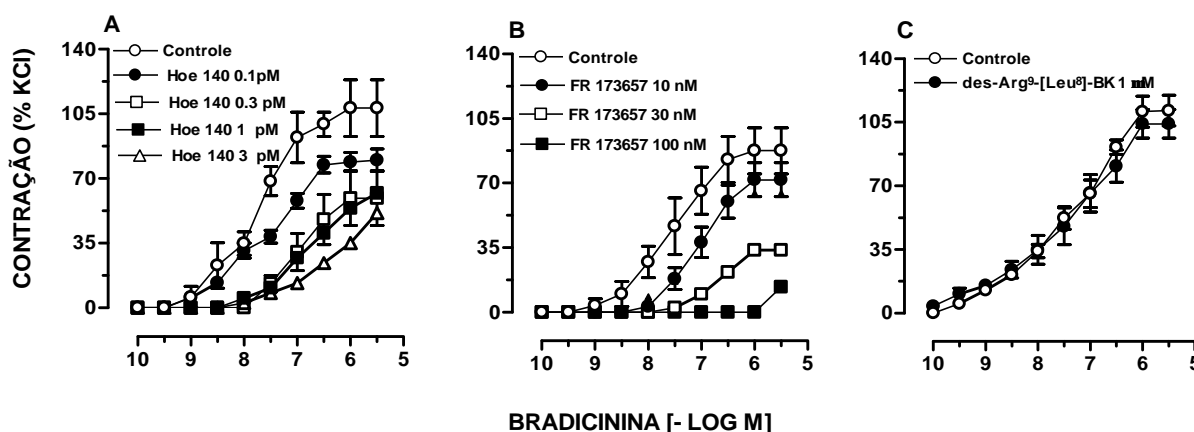


Figura 2 – Curvas concentração-resposta cumulativas obtidas para a BK na íris isolada de porco, na ausência ou na presença do (A) HOE 140 (0.1, 0.3, 1 e 3 pM); (B) FR173657 (10, 30 e 100 nM) ou (C) des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK (1 μM). Os resultados são expressos como percentagem da contração induzida pelo KCl (80 mM). Cada ponto representa as médias e as linhas verticais, os E.P.M. de cinco experimentos. Em alguns pontos, os erros estão inseridos nos símbolos.

4.2 Análise da participação do ácido araquidônico nas respostas contráteis induzidas pela BK na íris isolada de porco

Inicialmente, foi analisada a possível participação dos metabólitos da via da ciclooxigenase (COX) nas respostas contráteis induzidas pela BK. A pré-incubação das preparações com indometacina (1 μM) ou com o ibuprofeno (10 μM) (inibidores não seletivos para COX-1 e COX-2) resultou em inibição significativa da resposta contrátil induzida pela BK, com inibição máxima (Imax) de 52 ± 5 e $47 \pm 6\%$, respectivamente (Figura 3A e B). Complementando esses dados, foram adicionados às preparações os inibidores preferenciais para a COX-1, o valeryl salicilato (10 μM) ou para a COX-2 o NS398 (10 μM). Os resultados demonstraram que ambos os inibidores causaram inibição significativa da resposta contrátil induzida pela BK com Imax de 33 ± 5 e $53 \pm 8\%$, respectivamente (Figura 3C e D).

Na sequência, visando a analisar o envolvimento dos leucotrienos e do tromboxano A₂ na resposta contrátil à BK na íris isolada de porco, as preparações foram incubadas com o inibidor do tromboxano A₂ (dazoxiben, 100 nM) ou com o

antagonista do receptor do leucotrieno D₄ (MK571, 100 nM). Os resultados apresentados na Figura 3 (E e F) demonstram que esses antagonistas foram capazes de inibir de forma significativa a resposta contrátil induzida pela BK com I_{max} de 23 ± 4 e $33 \pm 6\%$, respectivamente.

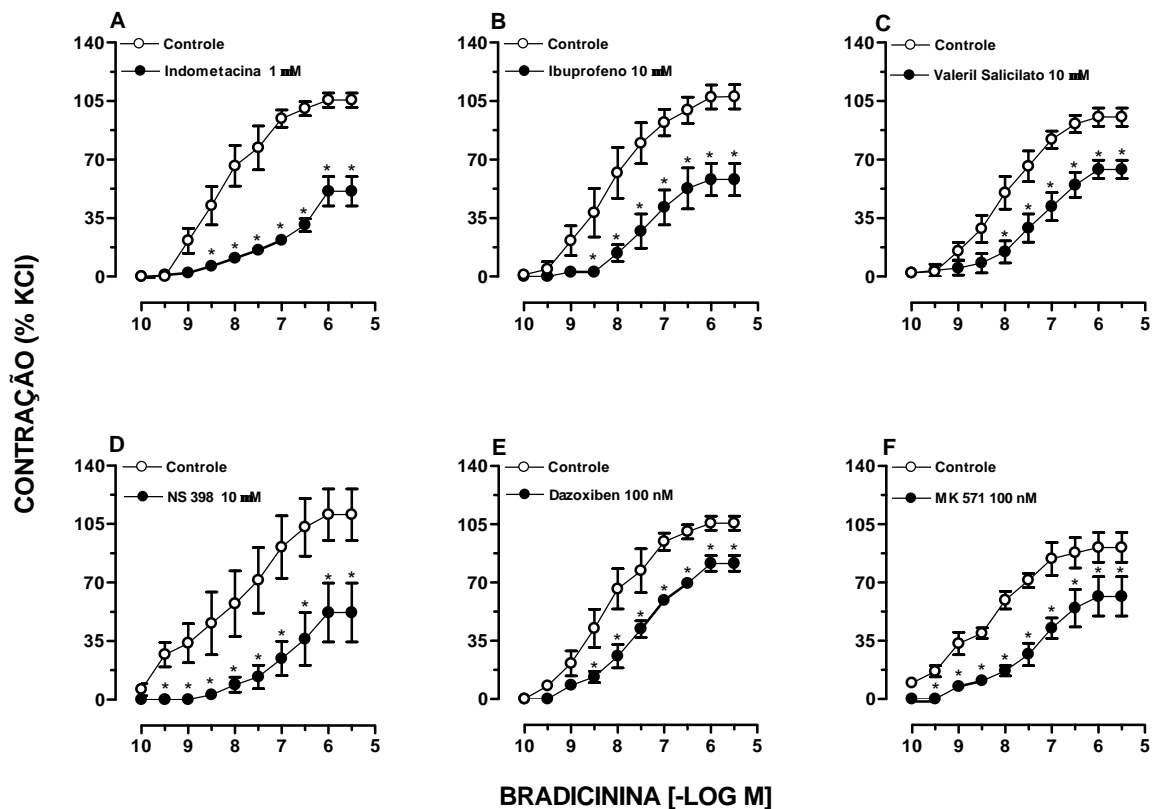


Figura 3 – Curvas concentração-resposta cumulativas obtidas para BK na íris isolada de porco, na ausência ou na presença da (A) indometacina (1 μ M); (B) ibuprofeno (10 μ M) e (C) valeril salicilato (10 μ M), (D) NS398 (10 μ M), (E) dazoxiben (100 nM) ou (F) MK571 (100 nM). Os resultados são expressos como percentagem da contração induzida pelo KCl (80 mM). Cada ponto representa as médias e as linhas verticais, os E.P.M. de cinco experimentos. Em alguns pontos, os erros estão inseridos nos símbolos. Diferenças significativas dos valores controle *P<0.05 (teste “t” de Student não pareado).

4.3 Análise do possível papel das proteínas quinases (PKs) na resposta contrátil induzida pela BK

Com o objetivo de analisar o envolvimento de várias PKs nas respostas contráteis induzidas pela BK na íris isolada de porco, construíram-se curvas concentração-resposta à BK, na ausência ou na presença de inibidores seletivos das quinases. Os resultados da Figura 4 (A e B) demonstram que o KT5720 (100nM, inibidor da PKA) e o GF109203X (1 μ M, inibidor da PKC) foram capazes de inibir de forma significava ($42 \pm 2\%$ e $37 \pm 4\%$, respectivamente) a resposta contrátil induzida pela BK na íris isolada de porco.

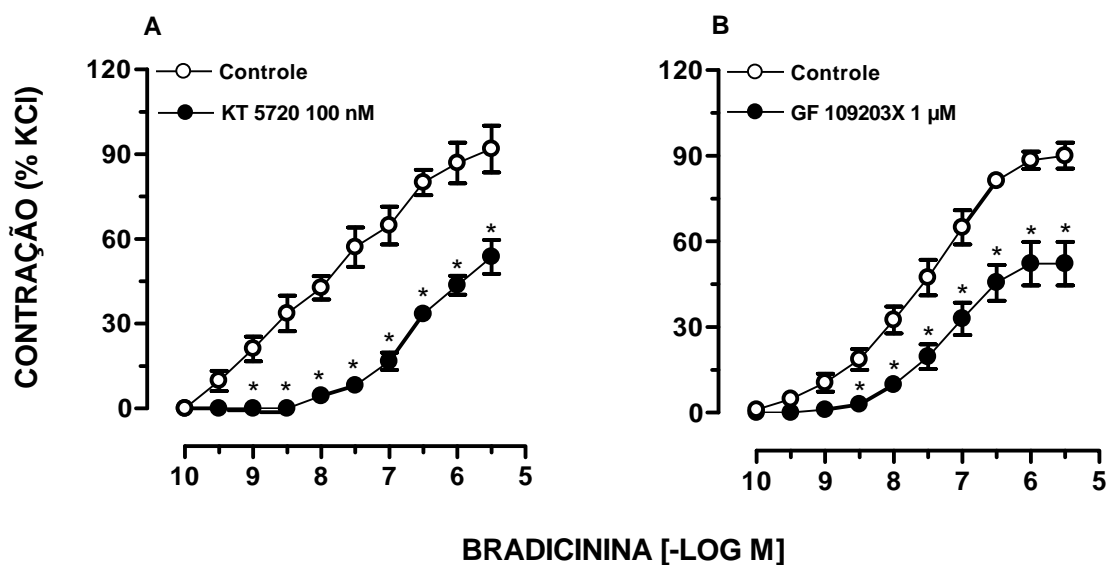


Figura 4 – Curvas concentração-resposta cumulativas obtidas para a BK na íris isolada de porco, na ausência ou na presença de (A) KT5720 (100 nM) ou (B) GF109203X (1 μ M). Os resultados são expressos como percentagem da contração induzida pelo KCl (80 mM). Cada ponto representa as médias e as linhas verticais, os E.P.M. de cinco experimentos. Em alguns pontos, os erros estão inseridos nos símbolos. Diferenças significativas dos valores controle * $P < 0.05$ (teste “t” de Student não pareado).

4.4 Participação dos canais de cálcio nas respostas contráteis induzidas pela BK na íris isolada de porco

Inicialmente, como está demonstrado na Figura 5 (A), para avaliar a participação do cálcio externo nas respostas contráteis induzidas pela BK nessa preparação, alguns experimentos foram realizados em meio contendo solução de Krebs sem o cálcio mais EGTA (1mM, agente quelante do cálcio). Nessas condições, a contração induzida pela BK na íris isolada de porco foi abolida. Ainda, quando as preparações foram novamente transferidas para meio contendo solução normal de Krebs (sem EGTA, mas com CaCl_2 2,5 mM) por 30 min, a contração mediada pela BK foi totalmente recuperada (Figura 5A).

A partir desses dados, passou-se a estudar quais canais de cálcio estariam participando da resposta contrátil induzida pela BK na íris isolada de porco. A pré-incubação das preparações com nicardipina (1 μM , bloqueador de canal de cálcio tipo L), ω -conotoxina GVIA (0,1 μM , bloqueador seletivo de canal de cálcio tipo N) ou ω -agatoxina IVA (0,1 μM , bloqueador de canal de cálcio tipo P) resultou em inibição significativa da resposta contrátil induzida pela BK com IM de 39 ± 5 , 29 ± 7 , $36 \pm 3\%$, respectivamente (Figura 5B, C, D).

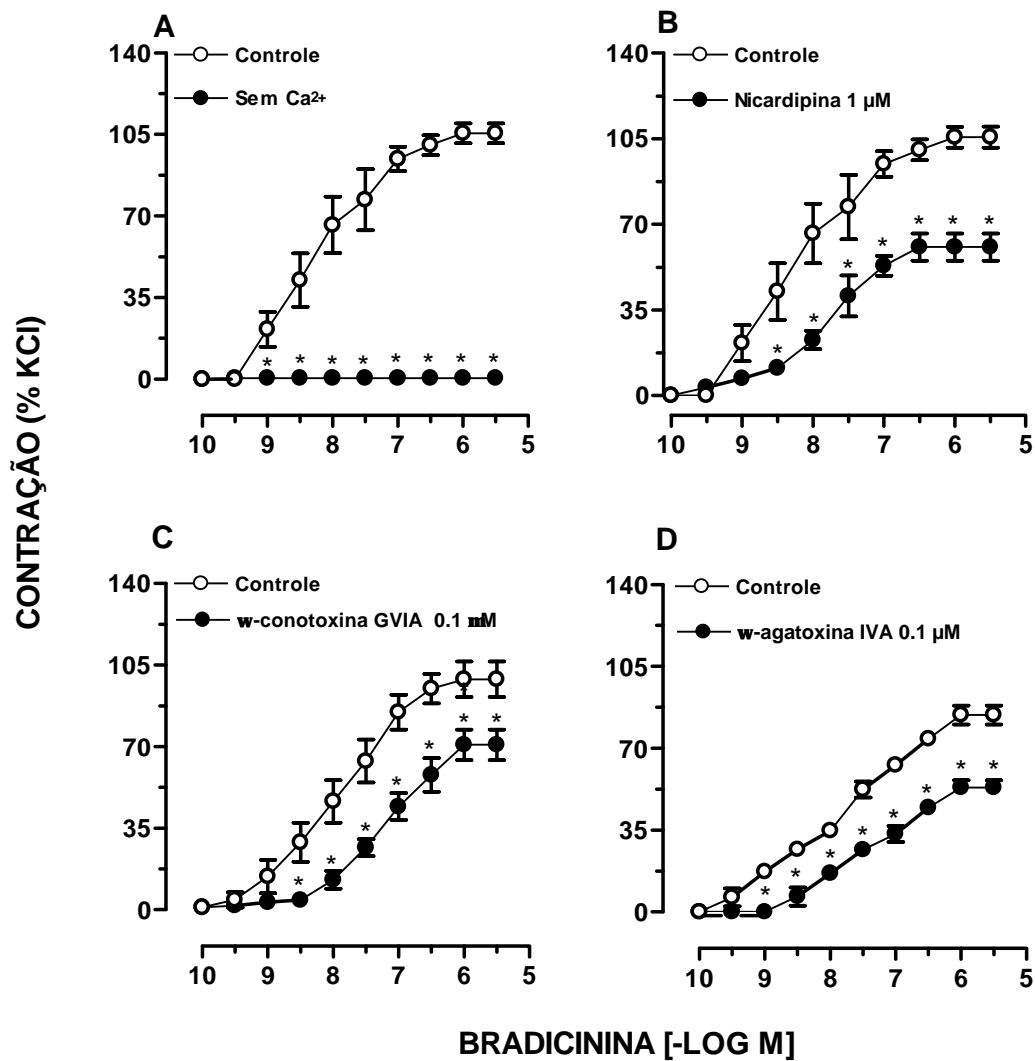


Figura 5 – Curvas concentração-resposta cumulativas obtidas para a BK na íris isolada de porco, na ausência ou na presença do (A) meio sem cálcio, (B) nicardipina (1 μM), (C) ω -conotoxina GVIA (0,1 μM) ou (D) ω -agatoxina IVA (0,1 μM). Os resultados são expressos como percentagem da contração induzida pelo KCl (80 mM). Cada ponto representa as médias e as linhas verticais, os E.P.M. de cinco experimentos. Em alguns pontos, os erros estão inseridos nos símbolos. Diferenças significativas dos valores controle * $P < 0.05$ (teste “t” de Student não pareado).

4.5 Estudo da transmissão colinérgica, noradrenérgica e de canais de sódio sobre as respostas contráteis induzidas pela BK na íris isolada de porco

Os resultados da Figura 6 (A e B) demonstram que a pré-incubação das preparações com atropina (antagonista muscarínico, 1 μ M) foi capaz de deslocar para a direita a curva concentração-resposta da BK em cerca de 6,6 vezes ao nível da CE_{50} , enquanto a guanetidina (antagonista noradrenérgico, 1 μ M) causou inibição da resposta máxima da BK de $60 \pm 5\%$. Ainda na Figura 6 (C), pode-se observar que o bloqueador de canal de sódio, a tetrodotoxina (TTX) (1 μ M) inibiu significativamente a resposta contrátil induzida pela BK na íris isolada de porco com I_{max} de $31 \pm 3\%$, demonstrando, com esse efeito, o possível envolvimento dos canais de sódio nas respostas da BK nessa preparação.

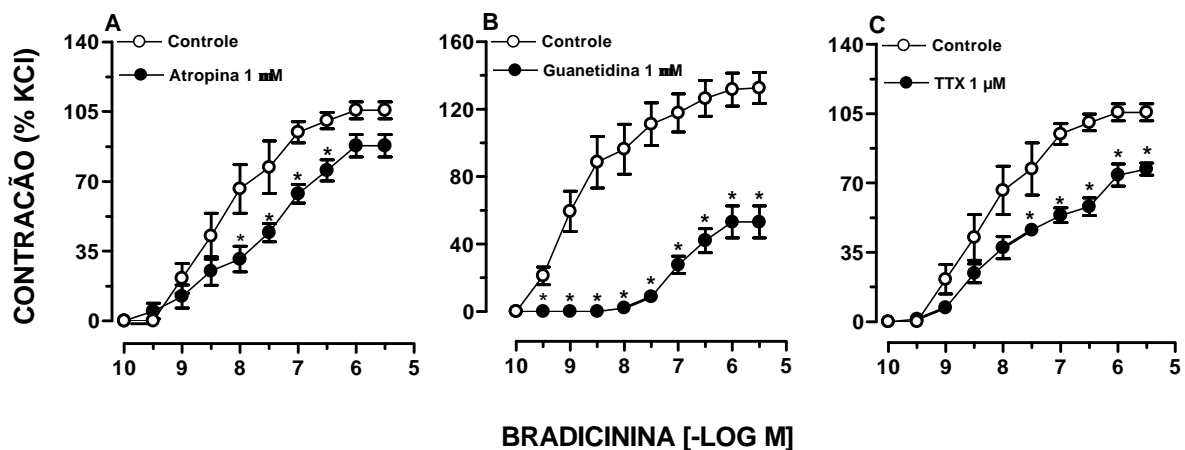


Figura 6 – Curvas concentração-resposta cumulativas obtidas para a BK na íris isolada de porco, na ausência ou na presença da (A) atropina (1 μ M); (B) guanetidina (1 μ M) e (C) tetrodotoxina (TTX) (1 μ M). Os resultados são expressos como porcentagem da contração induzida pelo KCl (80mM). Cada ponto representa as médias e as linhas verticais, os E.P.M. de cinco experimentos. Em alguns pontos, os erros estão inseridos nos símbolos. Diferenças significativas dos valores controle * $P < 0.05$ (teste “t” de Student não pareado).

4.6 Influência dos neuropeptídeos nas respostas contráteis induzidas pela BK na íris isolada de porco

A seguir, investigou-se a possível participação dos neuropeptídeos, incluindo a substância P, a neurocinina A, a neurocinina B e o CGRP, nas respostas contráteis induzidas pela BK na íris isolada de porco. Os resultados da Figura 7 (A, B e C) mostram que o FK888 (100 nM, antagonista do receptor NK₁), o SR48968 (100 nM, antagonista do receptor NK₂) e o SR142801 (100 nM, antagonista do receptor NK₃), foram capazes de inibir de forma significativa a resposta contrátil induzida pela BK na íris isolada de porco (I_{max} de 23 ± 2, 30 ± 7, 31 ± 2%, respectivamente). Ainda na Figura 7 (D), os resultados mostram que o fragmento do CGRP 8-37 (1 µM) também inibiu significativamente a contração induzida pela BK nessa preparação (I_{max} de 29 ± 3%).

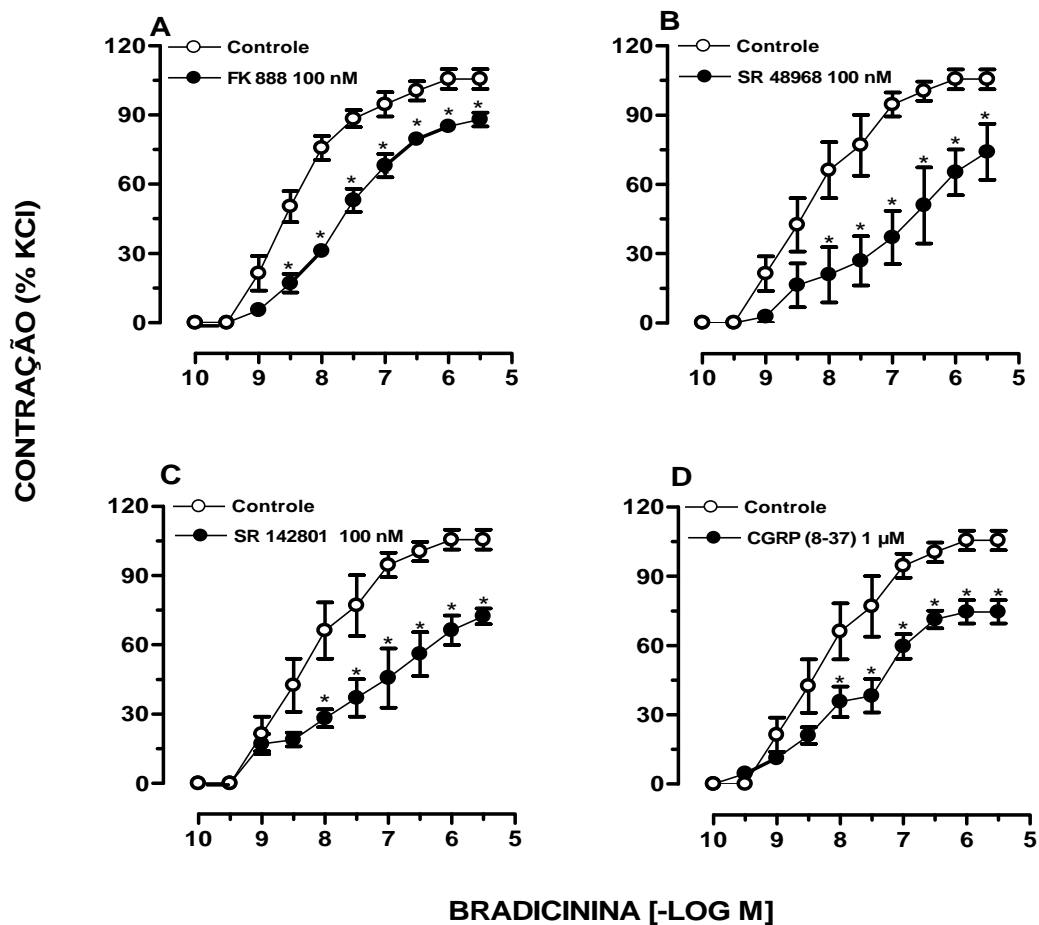


Figura 7 – Curvas concentração-resposta cumulativas obtidas para a BK na íris isolada de porco, na ausência ou na presença do (A) FK888 (100 nM), (B) SR48968 (100 nM), (C) SR142801 (100 nM), (D) CGRP (8-37) (1 μ M). Os resultados são expressos como percentagem da contração induzida pelo KCl (80 mM). Cada ponto representa as médias e as linhas verticais, os E.P.M. de cinco experimentos. Em alguns pontos, os erros estão inseridos nos símbolos. Diferenças significativas dos valores controle * $P < 0.05$ (teste “t” de Student não pareado).

Além disso, para complementar os resultados acerca da participação de neuropeptídeos nas respostas contráteis induzidas pela BK, foi também investigado o possível envolvimento dos receptores vanilóides nessa preparação. Para tal, as preparações foram dessensibilizadas com a exposição de concentrações elevadas do agonista vanilóide, a capsaicina (10 μ M), durante 30 min, e a resposta da capsaicina foi totalmente abolida. Depois das lavagens e reequilíbrio das preparações, realizaram-se curvas concentração-resposta para a BK. Os resultados da Figura 8 (A) demonstram que, nessas condições experimentais, ocorreu inibição

significativa de $35 \pm 6\%$ da resposta contrátil induzida pela BK. Em uma nova série de experimentos, as preparações foram pré-incubadas com o antagonista do receptor vanilóide TRPV1, a capsazepina ($1 \mu\text{M}$), e os resultados demonstraram que o antagonista vanilóide causou inibição significativa ($32 \pm 5\%$) sobre a resposta contrátil induzida pela BK nessa preparação (Figura 8B).

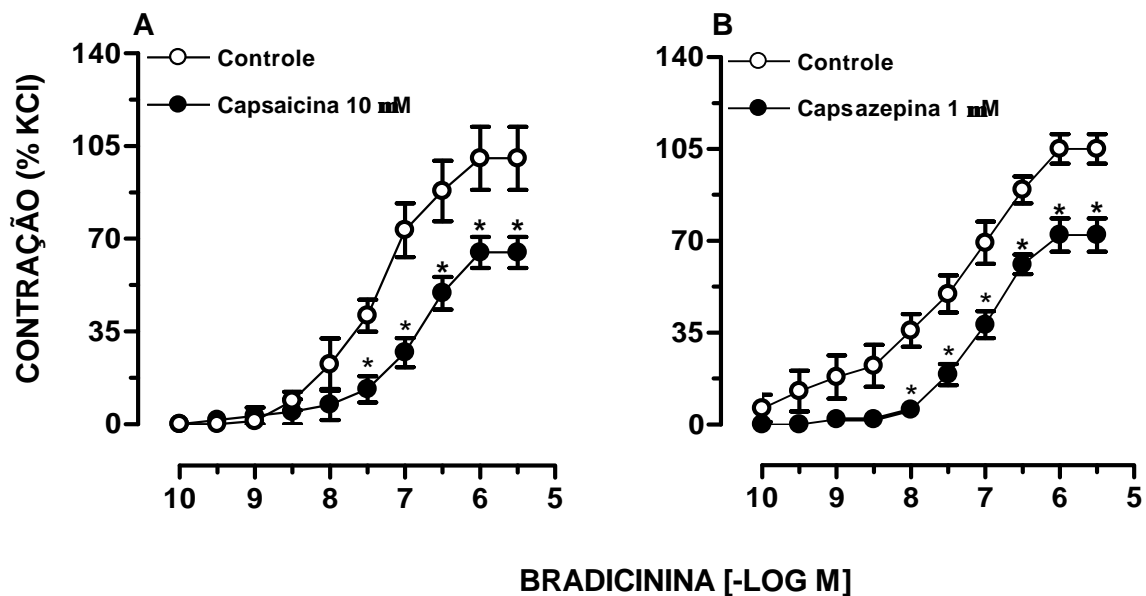


Figura 8 – Curvas concentração-resposta cumulativas obtidas para a BK na íris isolada de porco, na ausência ou na presença de (A) capsaicina ($10 \mu\text{M}$), (B) capsazepina ($1 \mu\text{M}$). Os resultados são expressos como porcentagem da contração induzida pelo KCl (80 mM). Cada ponto representa as médias e as linhas verticais, os E.P.M. de cinco experimentos. Em alguns pontos, os erros estão inseridos nos símbolos. Diferenças significativas dos valores controle * $P < 0.05$ (teste “t” de Student não pareado).

4.7 Estudo das respostas contráteis induzidas pelos agonistas do receptor B₁ na íris isolada de porco após tratamento com LPS

Resultados anteriores demonstraram que, nessa preparação, os receptores B₁ não estão presentes de forma constitutiva (ver Figura 1). A partir desses dados, foi avaliada a possibilidade de indução do receptor B₁ na íris de porco pela pré-incubação das preparações com LPS *in vitro*. Desse modo, após a exposição ao LPS, observou-se uma significativa resposta contrátil para o agonista do receptor B₁, a des-Arg⁹-BK, nessa preparação, sendo essa resposta avaliada nos tempos de 2, 4, 6, 12 e 24 h, após a adição do LPS (Figura 1).

Diante dos resultados obtidos, passou-se a caracterizar a indução do receptor B₁ após a quarta hora, pois foi o intervalo em que a des-Arg⁹-BK apresentou o maior efeito contrátil após a adição do LPS. Além disso, os resultados também mostraram que, a partir da quarta hora, há decréscimo gradual da resposta contrátil induzida pela des-Arg⁹-BK, na íris isolada de porco (Figura 9A).

Ainda nessa preparação, foi analisada a resposta contrátil para o outro agonista B₁, a Lys¹⁰-des-Arg⁹-BK. Os resultados da Figura 9 (B) demonstram que a resposta contrátil à Lys-des-Arg⁹-BK não apresenta diferença significativa em relação àquela causada pela des-Arg⁹-BK na íris isolada de porco. Adicionalmente, foram também comparadas as respostas do agonista do receptor B₂, a BK, na presença e na ausência do LPS. Os resultados da Figura 9 (C) demonstram que as respostas contráteis à BK nas preparações pré-tratadas com LPS foram reduzidas significativamente, quando comparadas com as causadas pelo agonista B₂ na íris isolada de porco sem LPS.

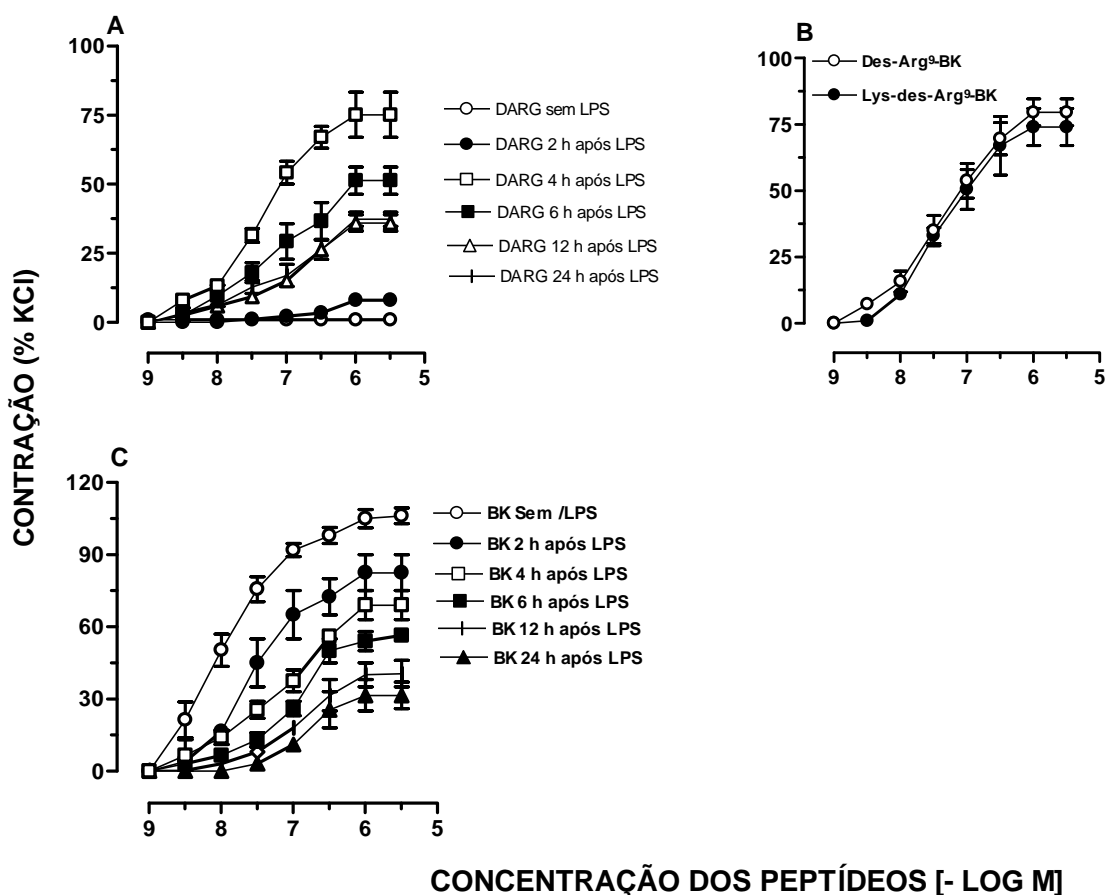


Figura 9 – Curvas concentração-resposta cumulativas obtidas para as cininas na presença do LPS na íris isolada de porco (A) des-Arg⁹-BK (DARG) em diferentes intervalos de tempo após a adição de LPS (5 µg/mL), (B) Lys-des-Arg⁹-BK, (C) BK na ausência e na presença do LPS. Os resultados são expressos como percentagem da contração induzida pelo KCl (80 mM). Em alguns pontos, os erros estão inseridos nos símbolos. Cada ponto representa as médias e as linhas verticais, os E.P.M. de cinco experimentos.

4.8 Efeito dos antagonistas seletivos do receptor B₁ sobre as respostas contráteis induzidas pela des-Arg⁹-BK na íris isolada de porco

Os resultados da Figura 10 (A, B e C) mostram que os antagonistas seletivos para o receptor B₁, a des-Arg⁹-Leu⁸-BK (3, 10 e 30 µM), o R-715 (1, 3 e 10 nM), e o antagonista benzodiazepínico 1 (3, 10 e 30 nM) foram capazes de antagonizar de forma não competitiva a resposta contrátil induzida pela des-Arg⁹-BK na íris isolada de porco exposta ao LPS. Por outro lado, o antagonista do receptor B₂, o HOE 140,

mesmo em concentração elevada (30 nM), não interferiu de forma significativa na resposta contrátil induzida pela des-Arg⁹-BK, nessa preparação (Figura 10D).

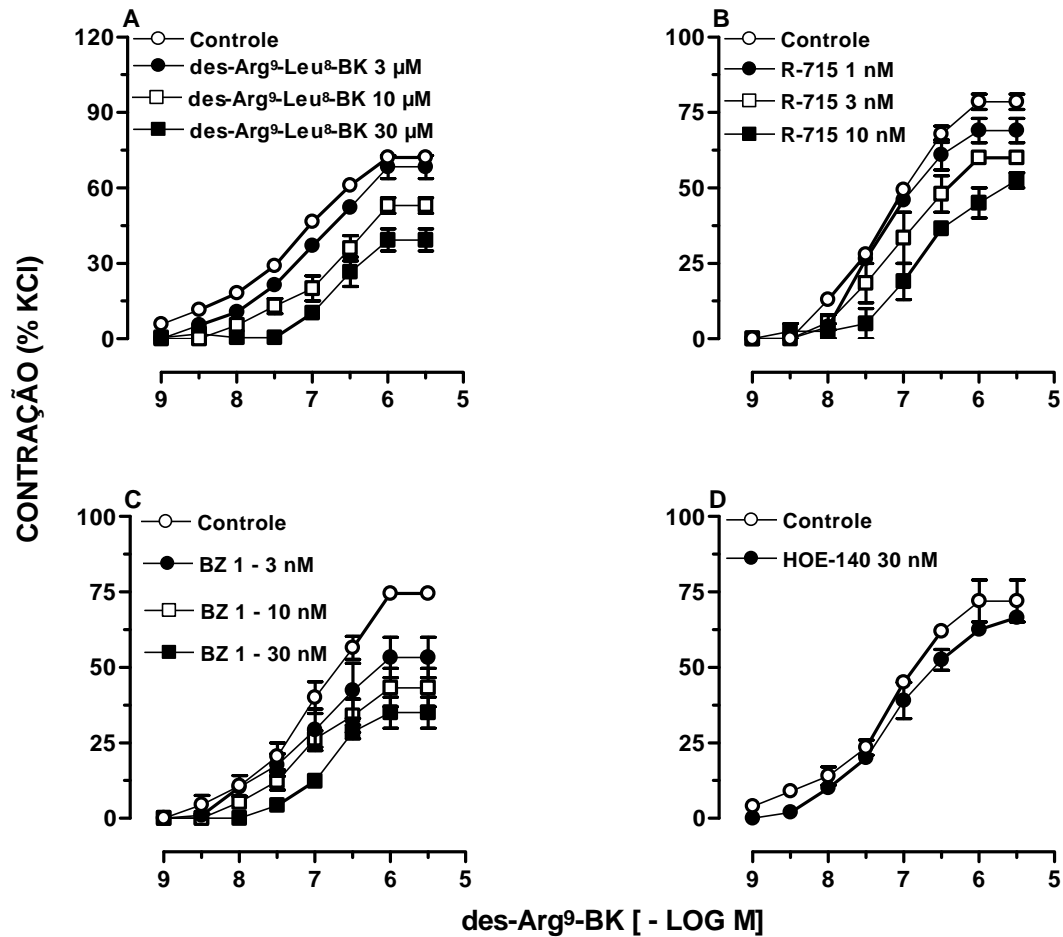


Figura 10 – Curvas concentração-resposta cumulativas obtidas para a des-Arg⁹-BK na íris isolada de porco, na ausência ou na presença da (A) des-Arg⁹-Leu⁸-BK (100 nM), (B) R-715 (1, 3, 10 nM), (C) BZ-1 (3, 10, 30 nM), (D) HOE 140 (30 nM). Os resultados são expressos como percentagem da contração induzida pelo KCl (80 mM). Cada ponto representa as médias e as linhas verticais, os E.P.M. de cinco experimentos. Em alguns pontos, os erros estão inseridos nos símbolos.

4.9 Efeito dos metabólitos do ácido araquidônico nas respostas contráteis induzidas pela des-Arg⁹-BK na íris isolada de porco

Quando foi analisado o envolvimento dos metabólitos derivados da via do ácido araquidônico nas respostas contráteis induzidas pelo agonista dos receptores B₁, a des-Arg⁹-BK, nessa preparação, inicialmente, utilizou-se o SC 560 (1 µM, inibidor da COX-1) e o NS398 (1µM, inibidor seletivo da COX-2). Os resultados demonstraram que ambos os antagonistas foram capazes de inibir de forma significativa ($21 \pm 4\%$ e $55 \pm 6\%$, respectivamente) a resposta contrátil máxima induzida pela des-Arg⁹-BK na íris isolada de porco exposta ao LPS (Figura 11A e B).

Além disso, a pré-incubação das preparações, nas mesmas condições, com o dazoxiben (inibidor da síntese do tromboxano A₂, 100nM) ou com o MK571 (inibidor do leucotrieno D₄, 100nM) inibiram significativamente a resposta contrátil induzida pela des-Arg⁹-BK com IM de 54 ± 2 e $49 \pm 2\%$, respectivamente (Figura 11C e D).

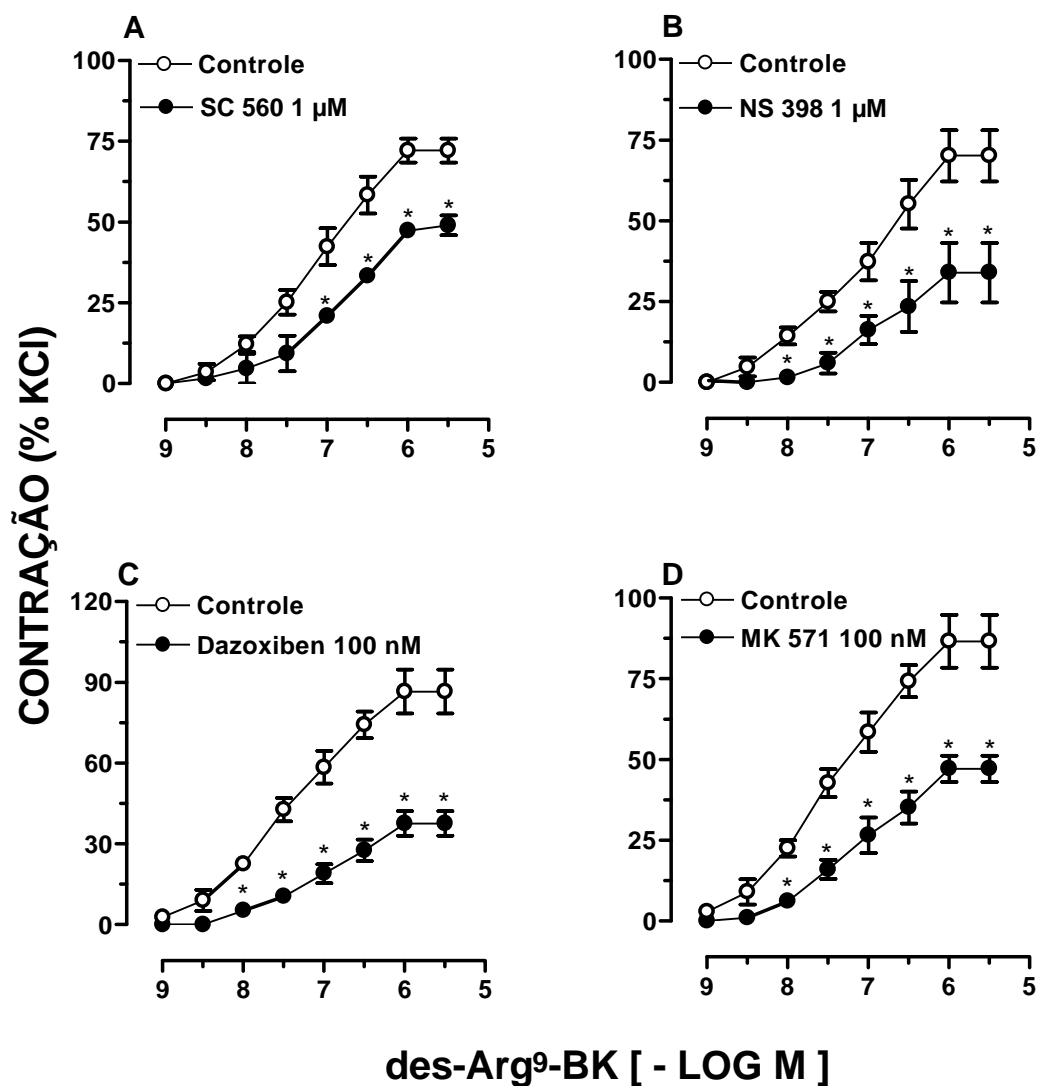


Figura 11 – Curvas concentração-resposta cumulativas obtidas para a des-Arg⁹-BK na íris isolada de porco, na ausência ou na presença do (A) SC-560 (1 μ M), (B) NS398 (1 μ M), (C) dazoxiben (100 nM), (D) MK571 (100 nM). Os resultados são expressos como porcentagem da contração induzida pelo KCl (80 mM). Cada ponto representa as médias e as linhas verticais, os E.P.M. de cinco experimentos. Em alguns pontos, os erros estão inseridos nos símbolos. Diferenças significativas dos valores controle *P<0.05 (teste “t” de Student não pareado).

4.10 Efeito dos inibidores das proteínas quinases sobre as respostas contráteis induzidas pela des-Arg⁹-BK na íris isolada de porco

A Figura 12 (A e B) demonstra que os inibidores da PKC (GF109203X, 1 μ M) e da fosfatidilinositol 3-quinase (LY294002, 1 μ M) foram capazes de inibir de forma significativa a resposta contrátil induzida pela des-Arg⁹-BK na íris isolada de porco exposta ao LPS. As inibições observadas foram 30 ± 2 e $37 \pm 2\%$, respectivamente. Além disso, também os inibidores da p38-MAPK (SB203580, 10 μ M) e da MEK-1 (PD98059, 10 μ M) causaram inibição significativa da resposta contrátil induzida pela des-Arg⁹-BK ($28 \pm 2\%$ e $66 \pm 2\%$, respectivamente) (Figura 12 C e D).

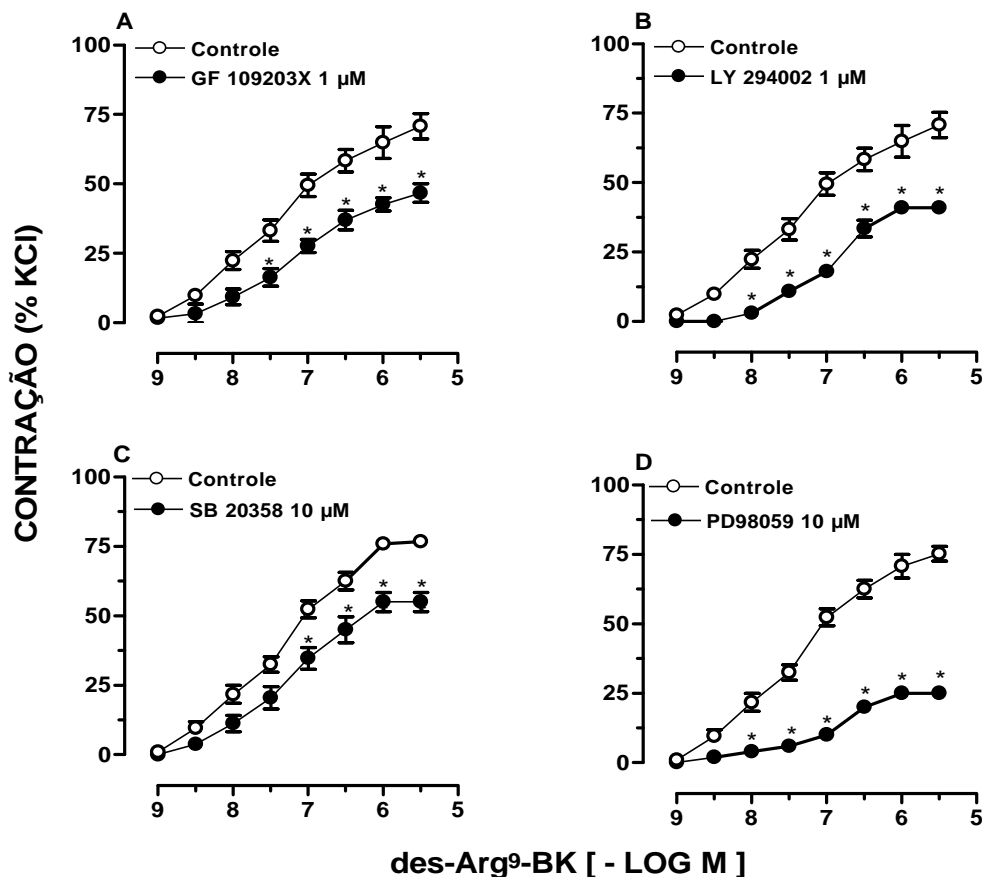


Figura 12 – Curvas concentração-resposta cumulativas obtidas para a des-Arg⁹-BK na íris isolada de porco na ausência e na presença do (A) GF109203X (1 μ M), (B) LY294002 (1 μ M), (C) SB20358 (10 μ M), (D) PD98059 (10 μ M). Os resultados são expressos como porcentagem da contração induzida pelo KCl (80 mM). Cada ponto representa as médias e as linhas verticais, os E.P.M. de cinco experimentos. Em alguns pontos, os erros estão inseridos nos símbolos. Diferenças significativas dos valores controle *P<0.05 (teste “t” de Student não pareado).

4.11 Participação dos canais de cálcio nas respostas contráteis induzidas pela des-Arg⁹-BK na íris isolada de porco

Com o objetivo de analisar a participação dos canais de cálcio nas respostas contráteis induzidas pela des-Arg⁹-BK na íris de porco *in vitro*, as preparações foram expostas ao LPS e construíram-se curvas concentração-resposta para o agonista seletivo do receptor B₁, a des-Arg⁹-BK, na presença ou na ausência do cálcio externo. Inicialmente, foi analisada a participação do cálcio externo nas respostas contráteis induzida pela des-Arg⁹-BK, mediante a retirada do cálcio do meio que contém a solução de Krebs e adição de EGTA (1 mM, agente quelante do cálcio) (Figura 13A). Os resultados mostraram que a resposta contrátil induzida pelo agonista do receptor B₁, a des-Arg⁹-BK, foi abolida em meio sem cálcio extracelular. No entanto, quando as preparações foram novamente transferidas para um meio contendo solução normal de Krebs (cálcio 2,5 mM) por 30 min, a contração mediada pela des-Arg⁹-BK foi totalmente recuperada (Figura 13A).

Na continuidade dos estudos, analisou-se o envolvimento dos canais de cálcio tipo L através do seu inibidor, a nicardipina (1 µM), (Figura 13B) e os resultados revelaram uma pequena inibição da resposta contrátil induzida pela des-Arg⁹-BK na íris de porco *in vitro*, com I_{max} de 28 ± 3%. Por outro lado, como demonstrado na Figura 13C e D, a utilização de antagonistas seletivos para os canais de cálcio do tipo N, a ω-agatoxina IVA (0,1 µM), e P, a ω-agatoxina MVIIA (0,1 µM), não foi capaz de causar alteração significativa da resposta contrátil induzida pela des-Arg⁹-BK na íris isolada de porco.

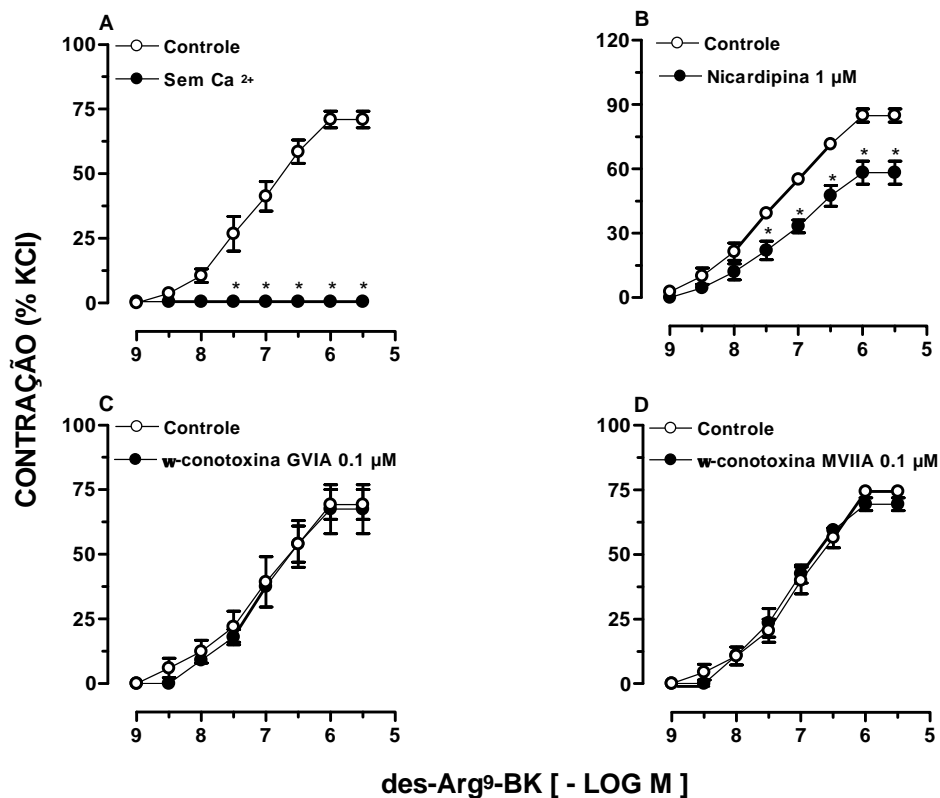


Figura 13 – Curvas concentração-resposta cumulativas obtidas para a des-Arg⁹-BK na íris isolada de porco (A), na ausência ou na presença do cálcio, (B) nicardipina (1 μM), (C) ω-conotoxina GVIA (0,1 μM), (D) ω-conotoxina MVIIA (0,1 μM). Os resultados são expressos como percentagem da contração induzida pelo KCl (80 mM). Cada ponto representa as médias e as linhas verticais, os E.P.M. de cinco experimentos. Em alguns pontos, os erros estão inseridos nos símbolos. Diferenças significativas dos valores controle *P<0.05 (teste “t” de Student não pareado).

4.12 Estudo dos neuropeptídeos sobre as respostas contráteis induzidas pela des-Arg⁹-BK na íris isolada de porco

O possível envolvimento dos neuropeptídeos nas respostas contráteis induzidas pela des-Arg⁹-BK, nessa preparação, foi analisado pelo emprego de alguns antagonistas seletivos para os receptores NK₁, NK₂, NK₃ e do CGRP. Os resultados da Figura 14 (A, B, C e D) demonstram que a pré-incubação das preparações com os antagonistas seletivos dos receptores NK₁ (FK888, 100 nM), NK₂ (SR48968, 100 nM), NK₃ (SR142801, 100 nM) ou com o fragmento do CGRP

8-37 (1 μ M) não foi capaz de causar alteração significativa na resposta contrátil induzida pela des-Arg⁹-BK na íris isolada de porco.

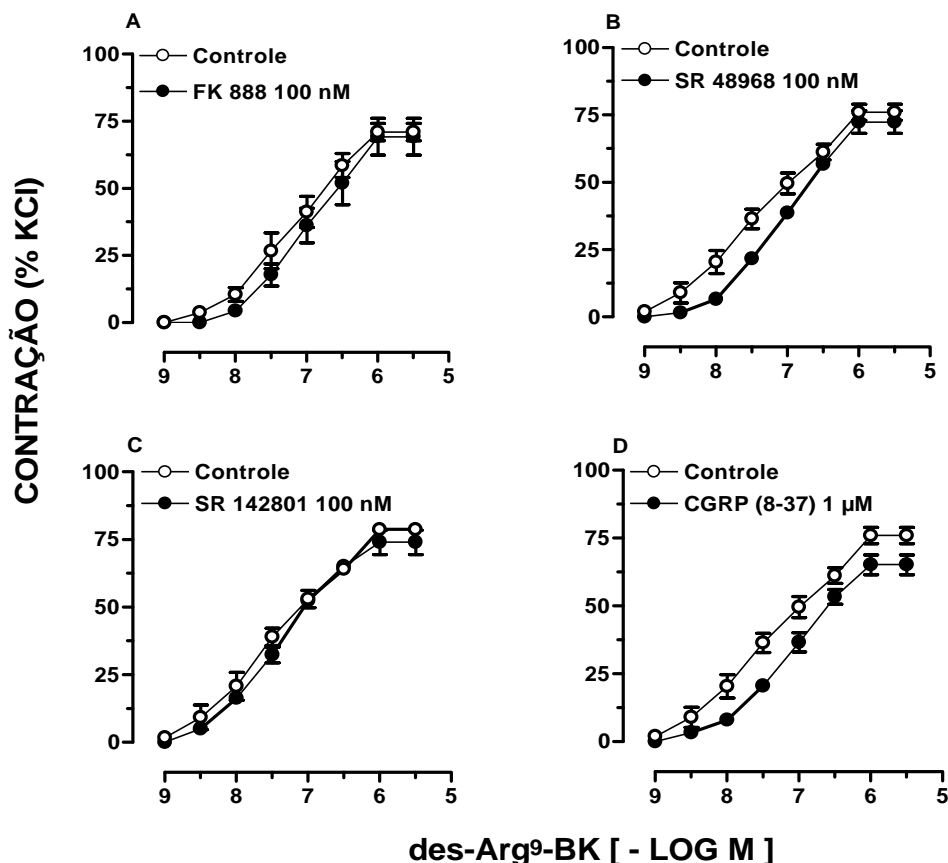


Figura 14 – Curvas concentração-resposta cumulativas obtidas para a des-Arg⁹-BK na íris isolada de porco, na ausência e na presença do (A) FK 888 (100 nM), (B) SR 48968 (100 nM), (C) SR 142801 (100 nM) e (D) CGRP (8-37) (1 μ M). Os resultados são expressos como percentagem da contração induzida pelo KCl (80 mM). Cada ponto representa as médias e as linhas verticais, os E.P.M. de cinco experimentos. Em alguns pontos, os erros estão inseridos nos símbolos.

4.13 Análise dos possíveis mecanismos envolvidos na indução do receptor B₁ na íris de porco *in vitro* após incubação com LPS

Para caracterizar os mecanismos intracelulares envolvidos na indução do receptor B₁, as preparações foram continuamente incubadas com LPS, na ausência ou na presença do inibidor da síntese protéica, a cicloheximida (70 μ M, inibidor da transdução) ou dos inibidores da transcrição gênica, a actinomicina-D (1 μ M) e a dexametasona (100 μ M). Os resultados da Figura 15 (A, B e C) demonstram que os

inibidores utilizados foram capazes de inibir totalmente a contração induzida pela des-Arg⁹-BK na íris isolada de porco tratada com LPS. Ainda nessa preparação, foi utilizado o mesmo procedimento experimental para avaliar a seletividade desses antagonistas. Os resultados mostraram que a resposta contrátil induzida pelo carbacol nessa preparação, nas mesmas condições experimentais, não foi alterada significativamente pela presença desses inibidores, como está demonstrado na Figura 16 (A, B e C).

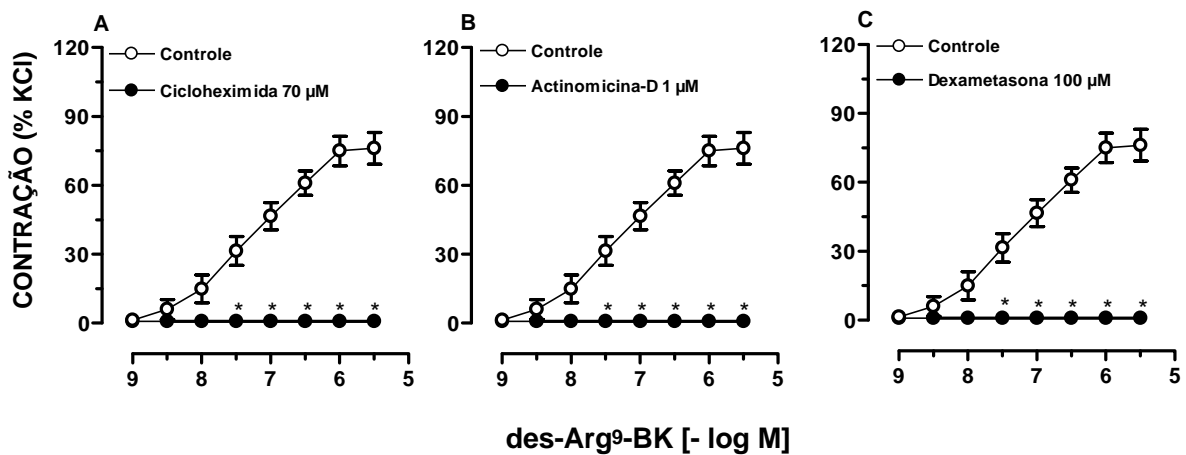


Figura 15 – Curvas concentração-resposta cumulativas obtidas para des-Arg⁹-BK, na íris isolada de porco, na ausência ou na presença dos seguintes inibidores incubados continuamente com LPS: (A) cicloheximida (70 µM), (B) actinomicina-D (1 µM) e (C) dexametasona (100 µM). Os resultados são expressos como percentagem da contração induzida pelo KCl (80 mM). Cada ponto representa as médias e as linhas verticais, os E.P.M. de cinco experimentos. Diferenças significativas dos valores controle *P<0.05 (teste “t” de Student não pareado).

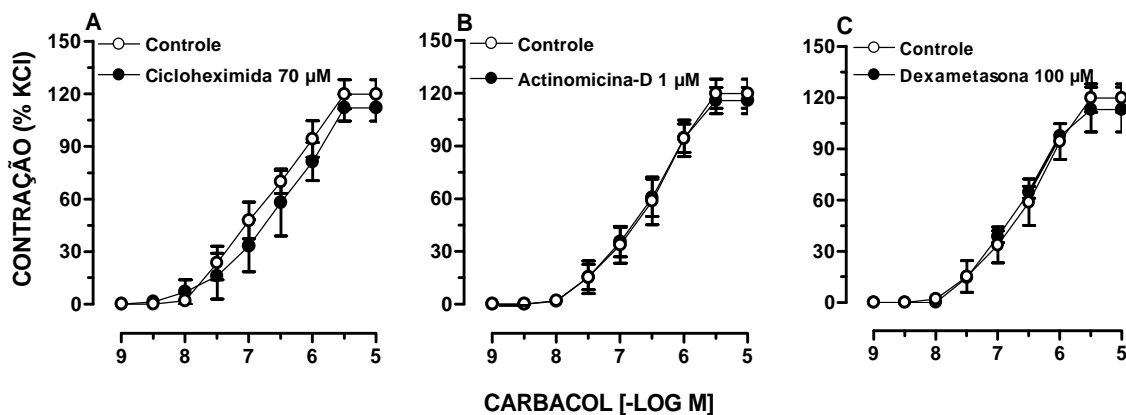


Figura 16 – Curvas concentração-resposta cumulativas obtidas para o carbacol na íris isolada de porco, na ausência ou na presença dos seguintes inibidores incubados continuamente com LPS: (A) cicloheximida (70 µM), (B) actinomicina-D (1 µM) e (C) dexametasona (100 µM). Os resultados são expressos como percentagem da contração induzida pelo KCl (80 mM). Cada ponto representa as médias e as linhas verticais, os E.P.M. de cinco experimentos.

Na seqüência, foi investigado o possível envolvimento do fator de transcrição NF- κ B nas respostas contráteis induzidas pela des-Arg⁹-BK, após incubação das preparações com LPS. A incubação das preparações com o inibidor do NF- κ B, o PDTC (300 μ M), juntamente com o LPS, causou inibição significativa ($48 \pm 1\%$) da resposta contrátil induzida pela des-Arg⁹-BK (Figura 17A). Quando esse inibidor foi testado em relação às respostas contráteis induzidas pelo carbacol, no mesmo procedimento experimental, os resultados mostraram que o PDTC não foi capaz de alterar de maneira significativa a resposta do carbacol na íris isolada de porco, como demonstrado na Figura 17 (B).

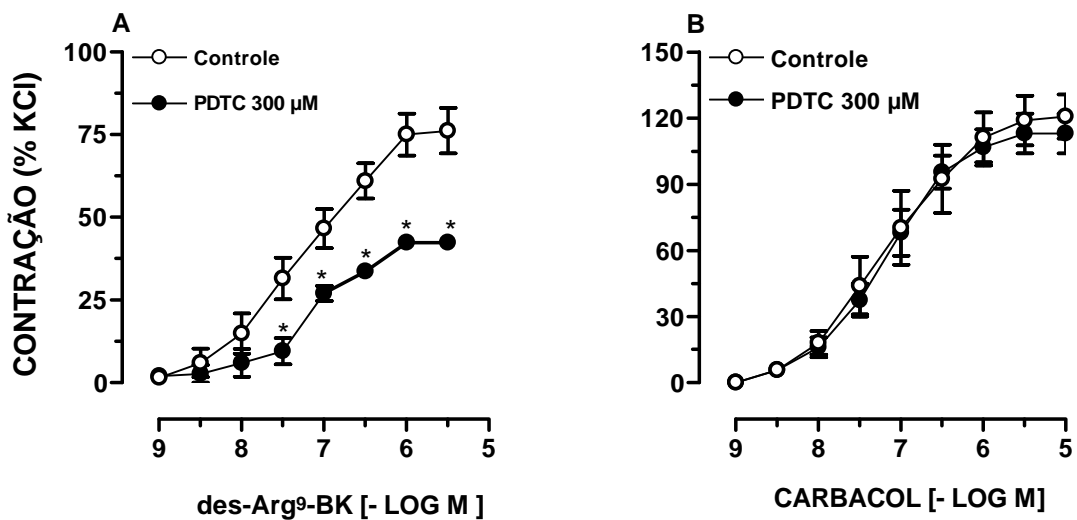


Figura 17 – Curva concentração-resposta cumulativa obtida para (A) des-Arg⁹-BK e (B) carbacol, na íris isolada de porco, na ausência ou na presença do PDTC (300 μ M) incubado continuamente com LPS. Os resultados são expressos como percentagem da contração induzida pelo KCl (80 mM). Cada ponto representa as médias e as linhas verticais, os E.P.M. de cinco experimentos. Em alguns pontos, os erros estão inseridos nos símbolos. Diferenças significativas dos valores controle * $P < 0.05$ (teste “t” de Student não pareado).

4.14 Análise do possível envolvimento das MAPKs na indução do receptor B₁ na íris de porco *in vitro* após incubação com LPS

Em outro grupo experimental, visando analisar o possível envolvimento das MAPKs na indução do receptor B₁ na íris isolada de porco, as preparações foram continuamente pré-incubadas com LPS e com os inibidores das MAPKs, o SB20358 (10 μ M, inibidor da p38 MAPK) ou o PD98059 (10 μ M, inibidor da MEK-1). Além disso, também foi utilizado, nesse protocolo experimental, o LY294002 (1 μ M, inibidor da fosfatidilinositol 3-quinase). Os resultados da Figura 18 (A, B e C) mostram uma redução significativa da resposta contrátil induzida pela des-Arg⁹-BK, na presença desses inibidores com I_{max} de $49 \pm 3\%$, $84 \pm 5\%$, $64 \pm 2\%$, respectivamente. Além disso, utilizando o mesmo modelo experimental, testaram-se as ações desses inibidores sobre as respostas contráteis induzidas pelo carbacol. Os resultados da Figura 19 (A, B e C) demonstram que esses bloqueadores, nas mesmas condições experimentais, não interferiram na resposta do carbacol.

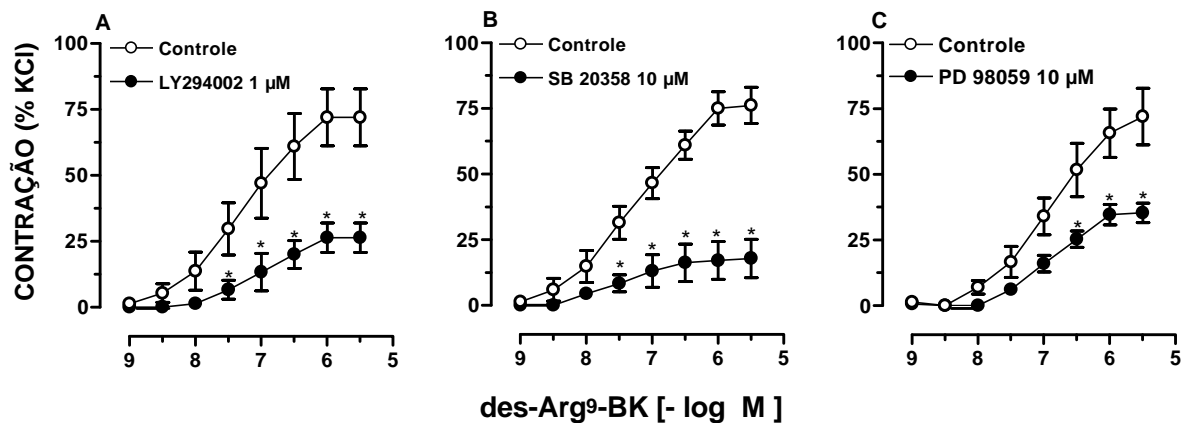


Figura 18 – Curvas concentração-resposta cumulativas obtidas para des-Arg⁹-BK na íris isolada de porco, na ausência ou na presença dos seguintes inibidores incubados continuamente com LPS: (A) LY294002 (1 μ M), (B) SB203580 (10 μ M), (C) PD98059 (10 μ M). Os resultados são expressos como percentagem da contração induzida pelo KCl (80 mM). Cada ponto representa as médias e as linhas verticais, os E.P.M. de cinco experimentos. Em alguns pontos, os erros estão inseridos nos símbolos. Diferenças significativas dos valores controle *P<0.05 (teste “t” de Student não pareado).

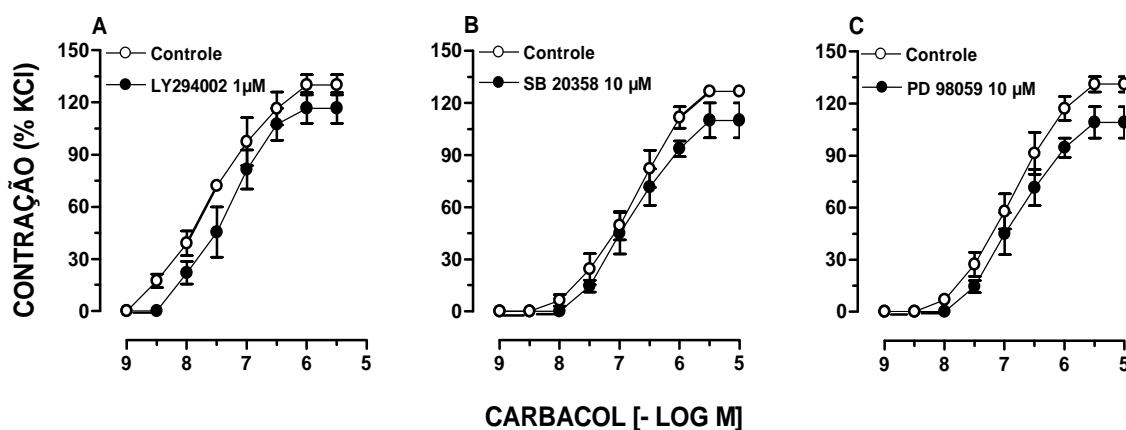


Figura 19 – Curvas concentração-resposta cumulativas obtidas para o carbacol na íris isolada de porco, na ausência e na presença dos seguintes inibidores incubados continuamente com LPS: (A) LY294002 (1 μ M), (B) SB203580 (10 μ M), (C) PD98059 (10 μ M). Os resultados são expressos como percentagem da contração induzida pelo KCl (80 mM). Cada ponto representa as médias e as linhas verticais, os E.P.M. de cinco experimentos. Em alguns pontos, os erros estão inseridos nos símbolos.

4.15 Ativação das MAPKs após a incubação com LPS na íris isolada de porco

Com o objetivo de avaliar o efeito da incubação da íris isolada de porco com LPS no padrão de expressão das MAPKs, foi realizado o ensaio de *western blot* para as formas total e fosforilada (forma ativada) dessas enzimas. Os resultados da (Figura 20 e 21) indicam que, em condições basais, não é possível detectar a presença das proteínas quinases p38 MAPK (Figura 20) e ERK (Figura 21). Por outro lado, observa-se ativação da p38 MAPK nos tempos de 5, 15 e 30 min, após a adição do LPS ao banho, sendo que, nos tempos de 60 e 120 min, há decréscimo da ativação. No entanto, quando as preparações foram expostas ao LPS e pré-tratadas com o inibidor da p38 MAPK, o SB203580, houve redução da ativação, a partir dos 15 min (Figura 21). Já para a ERK, ocorreu a ativação nos tempos de 5, 15 e 30 min, sendo que, em 60, 120 e 180 min, observou-se redução da ativação. Quando as preparações foram testadas com o inibidor da ERK, o PD98059, 5 min após a incubação, foi observada inibição da ativação da ERK (Figura 21).

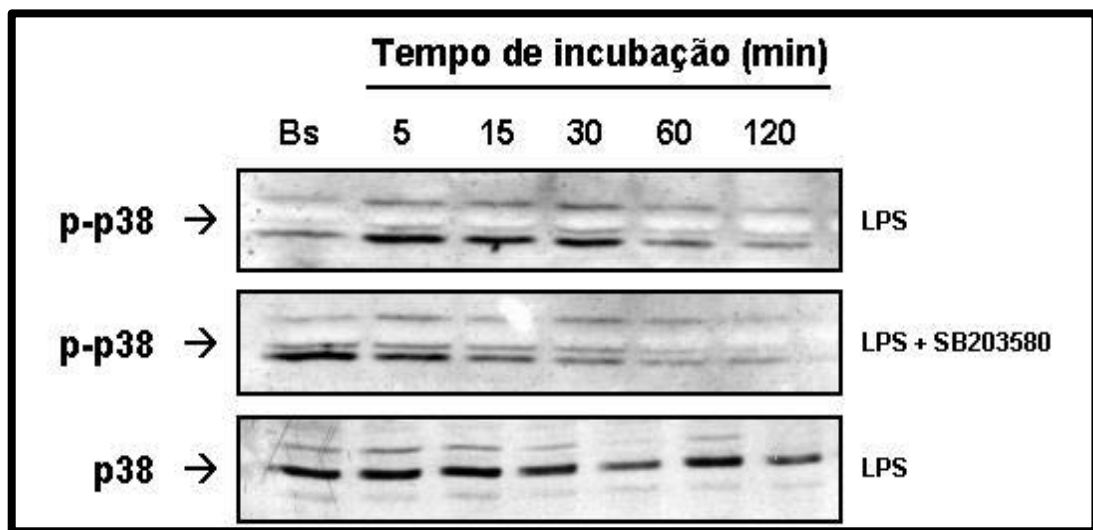


Figura 20 – Decurso temporal para ativação da p38 MAPK após a incubação *in vitro* das íris isoladas de porco com LPS. Níveis citosólicos (1 painel) p38 MAPK fosforilada, (2 painel) LPS+SB203580 e (3 painel) p38 MAPK total. Foram realizados três experimentos distintos.

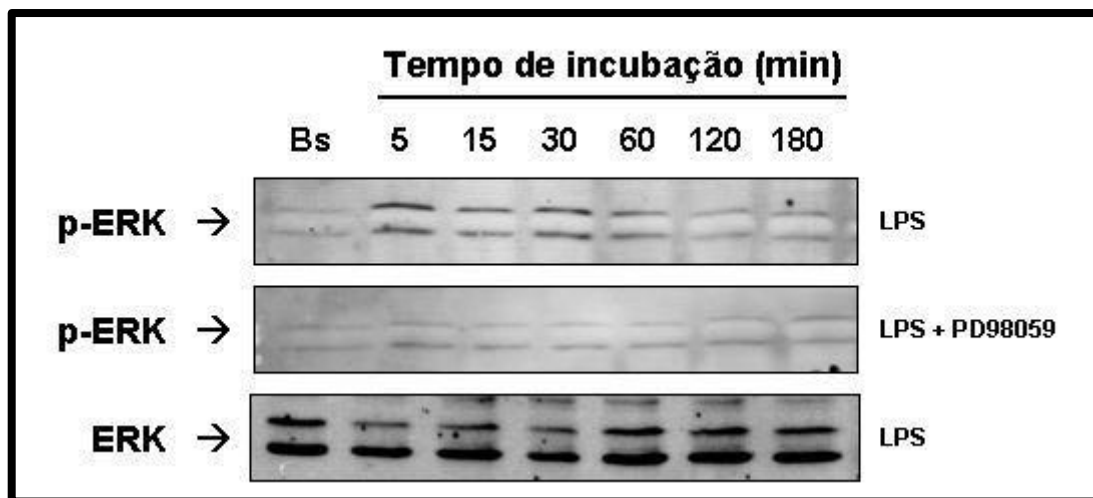


Figura 21 – Decurso temporal para ativação da ERK após a incubação *in vitro* das íris isoladas de porco com LPS. Níveis citosólicos (1 painel) ERK fosforilada, (2 painel) LPS+PD98059 e (3 painel) ERK total. Foram realizados três experimentos distintos.

5 DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE DAS RESPOSTAS CONTRÁTEIS INDUZIDAS PELA BK NA ÍRIS ISOLADA DE PORCO

As células musculares esqueléticas podem ser excitadas química, elétrica e mecanicamente, produzindo potencial de ação que é transmitido ao longo da fibra muscular e inicia a resposta contrátil, cuja fonte imediata de energia para a contração muscular é o ATP (BERRIDGE, 1993; WEBB, 2003; KERNELL, 2003). O potencial de ação no músculo deflagra a liberação de íons cálcio das regiões do retículo sarcoplasmático, próximas do sistema T (cisternas terminais). O cálcio ativa a atividade de adenosinatrifosfatase da miosina, iniciando a contração (SOMLYO e SOMLYO, 1994).

O retículo sarcoplasmático contém uma reserva de cálcio intracelular que pode ser mobilizada para aumentar transitoriamente a concentração de cálcio mioplasmático. Os canais de cálcio no retículo sarcoplasmático abrem-se em resposta aos sinais químicos. Os neurotransmissores, ou hormônios, que atuam via receptores ligados à proteína G, podem ativar a fosfolipase C, seguida pela geração de segundos mensageiros, incluindo o inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) (CARL *et al.*, 1996).

Algumas funções do sistema visual estão sob controle muscular. A forma do cristalino, por exemplo, é controlada por ação muscular, por meio de ligamentos suspensórios, ou fibras da zônula, que se ligam à parede do olho, no corpo ciliar, onde mantêm o cristalino posicionado atrás da íris. Devido ao fato de rodearem o cristalino, e por causa de seus ligamentos suspensórios, os músculos ciliares agem

como um esfíncter. Ao contrário, quando os músculos ciliares estão relaxados, a tensão exercida pelos ligamentos suspensórios achata o cristalino. Quando os músculos ciliares contraem-se, eles reduzem a tensão nos ligamentos suspensórios, o que permite ao cristalino, que é flexível, assumir uma forma mais esférica. Na camada média do globo ocular, onde está inserida a íris que contém fibras de músculo liso, orientadas radial e circularmente, estão presentes o músculo dilatador da pupila e o músculo do esfíncter, permitindo que a íris atue como um diafragma e controle o tamanho da pupila, que regula a quantidade de luz que entra (GILBERT e WIESEL, 1992; VAN *et al.*, 1992; BAYLOR, 1996).

No presente estudo, foram caracterizados, por meio de técnicas funcionais e bioquímicas, alguns dos mecanismos envolvidos nas respostas contráteis induzidas pelas cininas na íris isolada de porco. Essa espécie animal desperta grande interesse, uma vez que a anatomia do porco é, em muitos casos, semelhante à de humanos. O resultado da análise das respostas contráteis ao agonista seletivo para o receptor B_2 , a BK, e seus respectivos análogos, a Lys-BK e a Met-Lys-BK, demonstrou uma potente resposta contrátil para as cininas de forma dependente de concentração.

Já em relação à ordem de potência para os agonistas seletivos do receptor B_2 nessa preparação, não houve diferenças significativas. No entanto, o agonista seletivo para o receptor B_1 , a des-Arg⁹-BK, não causou nenhuma resposta contrátil detectável nessa preparação, quando analisado em até 90 min após o início da incubação *in vitro* ou 24 h após a montagem das preparações. Esses resultados sugerem que as respostas contráteis causadas pelas cininas na íris isolada de porco parecem ser mediadas pela presença constitutiva dos receptores B_2 .

Investigou-se, a seguir, com o emprego de antagonistas seletivos, o perfil farmacológico dos receptores que estariam participando da resposta contrátil induzida pela BK nessa preparação. Para isso, utilizaram-se antagonistas peptídicos e não-peptídicos seletivos para o receptor B₂, incluindo o HOE 140 e o FR173657, respectivamente. Interessantemente, os resultados demonstraram que ambos os antagonistas apresentam perfil de ação não-competitivo, em relação à resposta contrátil induzida pela BK. Além disso, o antagonista seletivo para o receptor B₁ (a des-Arg⁹-Leu⁸-BK, 1μM) não foi capaz de alterar a resposta contrátil induzida pela BK. Esses resultados confirmam os dados obtidos anteriormente no presente estudo, os quais indicam a presença dos receptores B₂, mas não dos receptores B₁ constitutivos nessa preparação.

Alguns dados da literatura mostram que o HOE 140 e o FR173657 apresentam antagonismo do tipo competitivo para a BK em alguns tecidos, como, por exemplo, no canal deferente de ratos e de camundongos, no estômago e na veia porta de rato e na bexiga e no íleo de cobaia (CAMPOS e CALIXTO, 1994; ALLOGHO *et al.*, 1996; CABRINI *et al.*, 1996). Contudo, em outras preparações de músculo liso, como, por exemplo, na artéria pulmonar humana, no íleo e na traquéia de cobaia e veia jugular de coelho, o HOE 140 demonstrou um perfil não-competitivo em relação à contração induzida pela BK (GRIESBACHER e LEMBECK, 1992; TRIFILIEFF *et al.*, 1992; FELETOU *et al.*, 1994 e 1995; ASANO *et al.*, 1998).

Já o antagonista seletivo não-peptídico para o receptor B₂, o FR173657, dependendo do tecido estudado, mostrou um perfil de antagonista competitivo na veia umbilical humana, veia jugular de coelho e em útero de rata (RIZZI *et al.*, 1997; GRIESBACHER *et al.*, 1997). Todavia, na artéria coronariana de porco, aorta de *hamster*, íleo de cobaia e na íris de coelho, foi observado um perfil de antagonismo

não-competitivo (RIZZI *et al.*, 1997; GRIESBACHER *et al.*, 1998; HALLE *et al.*, 2000). Em conjunto, tais resultados estendem evidências anteriores descritas na literatura, indicando a existência de variações importantes com relação ao perfil farmacológico dos antagonistas relacionados à espécie animal ou tecido estudado com relação (HALL, 1992).

A ativação dos receptores B₂ pode causar liberação dos mediadores envolvidos nos processos inflamatórios e dolorosos, relacionados aos metabólitos derivados da via do ácido araquidônico, tanto aqueles derivados da COX como da LOX. Além disso, observou-se a ocorrência de sinergismo entre as ações da BK e outros mediadores inflamatórios, como as prostaglandinas, serotonina e citocinas (para revisão ver: DRAY, 1997; CALIXTO *et al.*, 2000). Os resultados do presente estudo mostram que os derivados do ácido araquidônico, tanto aqueles derivados da COX como da LOX, estão envolvidos com as respostas contráteis induzidas pela BK, nessa preparação.

As lipooxigenases são classificadas de acordo com a posição em que efetuam a oxidação do ácido araquidônico. Embora existam três isoformas em mamíferos, 5-lipooxigenase, 12-lipooxigenase e 15-lipooxigenase, a primeira é a forma mais importante do ponto de vista biológico. Ela é encontrada principalmente em células que estão envolvidas em reações imunológicas e nos processos inflamatórios e catalisa o passo inicial para a síntese de leucotrienos (BERTOLINI *et al.*, 2001).

Por outro lado, das isoformas da COX conhecidas, somente três têm sua estrutura tridimensional caracterizada: COX-1 de ovinos, COX-2 recombinante de humanos e COX-2 recombinante de camundongos. A COX-2 encontra-se mais seletivamente distribuída nos tecidos de mamíferos do que a COX-1, que está

presente em quase todos os tecidos e células, regulando muitas funções fisiológicas por meio da liberação de prostaglandinas (PAIRET e ENGELHARDT, 1996). A COX-2 é uma enzima que se encontra expressa constitutivamente em alguns tecidos, como nas células da musculatura lisa e também nas células endoteliais e nos fibroblastos. Ainda, estudos recentes demonstraram a presença de outra isoforma, a COX-3, no sistema nervoso central, expressa no córtex cerebral, pituitária, hipotálamo, medula e cerebelo (CHANDRASEKHARAN *et al.*, 2002). A COX-3 é uma variante da COX-1, capaz de induzir inflamação gastrointestinal (LAUDANNO *et al.*, 2003), além de participar do aumento da temperatura corporal, sendo que esse efeito é bloqueado pelo acetaminofeno e pela aspirina (para revisão ver: BOTTING, 2003; AYOUB *et al.*, 2004).

Os mecanismos responsáveis pelo processo inflamatório promovido por mediadores liberados das células inflamatórias, bem como os metabólitos derivados da via do ácido araquidônico, ainda não estão totalmente esclarecidos em alguns processos patológicos (MASFERRER *et al.*, 1990, 1992; CALIXTO *et al.*, 2000). A presença tanto da COX-1 como da COX-2 foi caracterizada na íris e no corpo ciliar de coelho (DAMM *et al.*, 2001). Na íris humana, identificou-se constitucionalmente apenas a COX-1, enquanto a COX-2 pode ser expressa após a estimulação funcional (HAERINGEN *et al.*, 2000). Ainda no epitélio da íris de coelho *in vitro*, foi observada também a ativação da LOX (KING *et al.*, 1992).

Como mencionado, este estudo analisou o envolvimento dos metabólitos derivados da via do ácido araquidônico, incluindo os derivados da COX e da LOX, na resposta contrátil induzida pela BK na íris isolada de porco e, para analisar esses mecanismos, utilizaram-se inibidores não-seletivos da COX-1 e COX-2 (indometacina e ibuprofeno, respectivamente) e os antagonistas preferenciais da

COX-1 (valeril salicilato) ou da COX-2 (NS 398). Os resultados obtidos mostraram inibição significativa da resposta contrátil induzida pela BK na presença desses antagonistas e, de forma marcante, para o inibidor da COX-2. Além disso, o inibidor da síntese de TXA₂ (dazoxiben) e o antagonista do receptor para o leucotrieno D₄ (MK-571) também foram capazes de inibir significativamente a resposta contrátil à BK nessa preparação. Esses resultados sugerem, portanto, o envolvimento da via dos metabólitos derivados do ácido araquidônico como o LTD₄, TXA₂ e da COX-1 e COX-2 nas ações da BK, nessa preparação.

Estudos bioquímicos e farmacológicos têm demonstrado que a contração mediada pela BK no músculo liso vascular e não-vascular de várias espécies animais depende fundamentalmente do influxo de cálcio e também da ativação da fosfolipase C, que induz a liberação do cálcio intracelular e a ativação de certas proteínas quinases (XIONG *et al.*, 1997; DAVIES *et al.*, 2000; FRANK, 2002; BESANT *et al.*, 2003). Além disso, McEachern e colaboradores (1991) demonstraram que os receptores B₂ apresentam vários sítios susceptíveis à fosforilação por proteínas quinases A e C. Diante dos dados da literatura, procurou-se, neste estudo, caracterizar o possível envolvimento da PKA e da PKC nas respostas contráteis induzidas pela BK na íris de porco.

Para analisar a participação dessas proteínas quinases nessa preparação, foram utilizados os inibidores relativamente seletivos das PKA e PKC (KT5720 e GF109203X, respectivamente). Os resultados demonstraram que ambos os inibidores foram capazes de inibir de forma significativa a resposta contrátil induzida pela BK nessa preparação, sugerindo o envolvimento dessas proteínas quinases nas ações da BK na íris de porco.

A contração do músculo liso da íris, a exemplo de outros músculos lisos, também envolve a participação de íons cálcio que ativam a miosina-quinase, uma enzima intracelular que fosforila a miosina (GREENBERG, 1997). É conhecido que o influxo de cálcio do meio extracelular para o meio intracelular pode ocorrer por diferentes vias. Dentre elas, os canais de cálcio dependentes de voltagem constituem um dos mecanismos mais rápidos e eficientes que permitem o aumento do influxo de cálcio para o meio intracelular (DUNLAP *et al.*, 1995).

Os resultados deste estudo demonstram que a contração induzida pela BK na íris de porco é totalmente dependente do influxo do cálcio extracelular. Essa conclusão baseia-se no fato de que a retirada do cálcio do meio extracelular aboliu a resposta contrátil induzida pela BK. Além disso, também foram caracterizados, com o emprego de antagonistas seletivos, os subtipos de canais de cálcio que estariam participando das respostas da BK na íris de porco. Um dos antagonistas de canais de cálcio utilizados foi a nicardipina (antagonista seletivo de canal de cálcio tipo L). Esses canais são antagonizados pelas dihidropiridinas, incluindo a nifedipina, a nicardipina e outras substâncias não-dihidropiridinas, como o verapamil e o diltiazem (LLINÁS *et al.*, 1992). Os canais de cálcio do tipo L estão amplamente distribuídos em vários tecidos, apresentando importante participação na contração da musculatura lisa (LECCHINI *et al.*, 1991; ZADORODUYK *et al.*, 1994; TONSUN *et al.*, 1998).

Além do canal de cálcio do tipo L, também foi analisada a participação dos canais de cálcio do tipo P, utilizando-se a ω -agatoxina IVA, um bloqueador seletivo desse canal (SPEDDING e POLETTI, 1992; HEADY *et al.*, 2001). Esses canais foram descritos inicialmente no sistema nervoso central, mais precisamente, nas células de Purkinje (LLINÁS *et al.*, 1992). Fisiologicamente, esses canais estão

envolvidos na transmissão sináptica, na junção neuromuscular de mamíferos (KATZ *et al.*, 1997).

Por fim, foi analisado o possível envolvimento dos canais de cálcio do tipo N, usando-se o bloqueador desse canal – a ω -conotoxina GVIA, uma substância polipeptídica – purificado a partir do veneno do *Conus geographus*, uma espécie de caramujo marinho (KATZ *et al.*, 1997; JONES e BULAJ, 2000). Esses canais estando relacionados com a liberação de neurotransmissores, tanto no sistema nervoso central como periféricamente (McNAUGHTON e RANDALL, 1997). Os resultados deste estudo demonstraram a importante participação dos canais de cálcio do tipo L, N e P na resposta contrátil induzida pela BK na íris isolada de porco. Esses antagonistas, nas concentrações avaliadas, foram capazes de inibir significativamente a resposta contrátil induzida pela BK nessa preparação. Resultados semelhantes foram observados no estômago e no gânglio cervical superior de rato, nas células cerebrais de Purkinje e em miócitos cardíacos de embrião de galinha (DE SCHUTTER e BOWER, 1994; DAVIES *et al.*, 1996; CABRINI *et al.*, 1996; BIZRI-EL *et al.*, 2003).

Alguns estudos demonstraram que a BK induz um grande número de eventos fisiológicos, incluindo a ativação de células imunes, a excitação de fibras sensoriais e simpáticas pós-ganglionares e a liberação neuronal de vários mediadores (HALL e MORTON, 1997; CALIXTO *et al.*, 2000 e 2001). O músculo dilatador e o esfíncter da íris são inervados por fibras nervosas adrenérgicas e colinérgicas, em diversas espécies de animais (Para revisão, ver: VERECZKEY, 1991; YORIO e CLARK, 2003). Dentre as espécies mais estudadas, destacam-se o coelho, o gato e o rato, sendo que as respostas simpáticas e parassimpáticas nas espécies estudadas

apresentaram diferenças na distribuição de receptores e na função entre as espécies (PERSSON e SONMARK, 1971).

Os receptores adrenérgicos pré-sinápticos são divididos em três subtipos: α_{2A} , α_{2B} e α_{2C} (BYLUND *et al.*, 1994). A expressão do subtipo de receptor α_2 -adrenérgico foi caracterizada no sistema visual, principalmente na íris humana, e também no corpo ciliar de coelho e na retina de bovino (OSBORNE, 1982; MITTAG e TORMAY, 1985; SCHWINN, 1994; BERKOWITZ *et al.*, 1994). Ainda, mediante a técnica de autoradiografia, demonstrou-se que o subtipo α_2 -adrenérgico está presente na íris humana, no epitélio ciliar e muscular e na retina (MATSUO e CYNADER, 1992). A presença dos receptores α_2 também foi identificada em quatro diferentes partes do sistema visual de porco: coróide, corpo ciliar, íris e retina. A expressão do subtipo de receptor α_{2A} adrenérgico foi observada na íris de porco, enquanto na retina estão presentes os receptores α_{2A} e o α_{2C} (MATSSON-WIKBERG *et al.*, 1996; MATSSON-WIKBERG *et al.*, 2000). Ainda, os subtipos de receptores α_{2B} e α_{2C} adrenérgicos também foram caracterizados no corpo ciliar de humanos (HUANG *et al.*, 1995). É importante ressaltar que, clinicamente, o agonista seletivo do receptor α_2 -adrenérgico é usado para o tratamento do glaucoma, por causar decréscimo da pressão intraocular, tanto no homem como em animais (HARRISON e KAUFMANN, 1977; ROBIN, 1988; TORIS *et al.*, 1995).

Alguns estudos têm demonstrado que a BK ativa as fibras simpáticas cardíacas de coelho, rato e cão e também do rim de coelho (WANG *et al.*, 1999; ZHU *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2003). Neste estudo, procurou-se investigar a participação das fibras simpáticas e os mediadores que estariam participando das respostas contráteis induzidas pela BK na íris de porco. Os resultados demonstraram – com o emprego do bloqueador dos neurônios noradrenérgicos, a

guanetidina, cujo principal efeito consiste em inibir a liberação de noradrenalina das terminações nervosas simpáticas (ZHU *et al.*, 2002) - inibição significativa da resposta contrátil induzida pela BK. Dessa forma, esses resultados sugerem o envolvimento da liberação neuronal de noradrenalina das fibras simpáticas nas respostas contráteis causadas pela BK, nessa preparação.

A oftalmologia também tem interesse clínico no estudo da inervação colinérgica, com o objetivo de melhor entender algumas funções fisiológicas importantes no sistema visual. Os receptores muscarínicos são divididos em cinco subtipos: M₁, M₂, M₃, M₄ e M₅ (Para revisão, ver: EGLIN *et al.*, 1996; BONNER *et al.*, 1987 e 1988). Esses receptores estão distribuídos no trato gastrointestinal, genitourinário, vascular e ocular. Os receptores muscarínicos estão envolvidos em muitas ações fisiológicas da íris, na qual controlam a entrada de luz através da pupila. Os agonistas muscarínicos causam contração da musculatura lisa no esfíncter da íris de coelho, provocando miose, enquanto seus antagonistas causam midríase (CHOPPIN *et al.*, 1998). Estudos realizados tanto *in vivo* quanto *in vitro* no esfíncter da íris de rato e de coelho demonstraram a presença predominante do receptor muscarínico do tipo M₃ (AKHTAR *et al.*, 1987; HAGAN *et al.*, 1988). Além disso, foi encontrado número significativo de receptores muscarínicos do tipo M₃ na íris humana, contudo, foi também indicada a existência dos outros quatro subtipos desse receptor (GIL *et al.*, 1997).

Em nossos estudos, também se procurou investigar a participação do sistema colinérgico nas respostas contráteis induzidas pela BK na íris de porco. Em outras preparações como na bexiga de coelho e no cólon de cobaia foi demonstrado o importante envolvimento das fibras parassimpáticas na bexiga de coelho e no cólon de cobaia (CHOPPIN *et al.*, 1998; SANTICIOLI *et al.*, 2001). Para tal, investigação

utilizou-se o antagonista muscarínico, a atropina, um alcalóide de ocorrência natural encontrado em plantas solanáceas, capaz de bloquear não seletivamente os receptores muscarínicos no sistema parassimpático. Os resultados demonstraram, com o uso desse bloqueador, uma significativa inibição da resposta contrátil induzida pela BK na íris de porco. Desse modo, esses resultados permitem sugerir o envolvimento da liberação neuronal de acetilcolina nas respostas contráteis causadas pela BK nessa preparação, na qual, provavelmente, estão exercendo um importante papel fisiológico, causando miose na musculatura da íris.

Foi também demonstrado que a tetrodotoxina (bloqueador de canal de sódio), conhecida por impedir a liberação neuronal de neurotransmissores na fenda sináptica, foi capaz de inibir a resposta contrátil induzida pela BK nessa preparação, sendo esses resultados semelhantes aos demonstrados na íris de coelho (BYNKE *et al.*, 1983; UEDA *et al.*, 1984). Em conjunto, os dados deste estudo sugerem que as ações da BK na íris de porco parecem envolver a liberação neuronal de acetilcolina e de noradrenalina, além de a ativação de canais de sódio sensíveis à tetrodotoxina.

Bynke e colaboradores (1983) demonstraram que a BK causa contração do esfíncter da íris isolada de coelho, sendo parte dessa ação mediada pela liberação neuronal de SP. Nas estruturas oculares, tanto a SP como o CGRP já foram descritos em diversos sítios, nas mais variadas espécies (MARFURT *et al.*, 1989). Em ratos, a SP e o CGRP estão co-localizados em varicosidades de terminações nervosas dos nervos, tanto na córnea como na íris (BECKERS *et al.*, 1993; BAKHLE e BELL, 1994). Também na íris de rato, foi demonstrado que a contração da íris mediada pela SP é dependente da ativação de receptores taquicinérgicos dos subtipos NK₂ e NK₃, sem envolvimento aparente de receptores NK₁ (GRUMANN-JUNIOR *et al.*, 2000). Esses peptídeos também foram observados na íris de coelho

(BUTLER *et al.*, 1980; HAKANSON *et al.*, 1987), bem como em seres humanos (STONE e KUWAYAMA, 1985). Ainda, Hall e colaboradores (1995) demonstraram que, na conjuntiva e mucosa nasal de cobaia, o extravasamento plasmático induzido pela aplicação local de BK ocorre pela estimulação das terminações nervosas sensoriais e pela liberação de taquicininas. O presente estudo confirma e estende observações prévias (Grumann-Junior *et al.*, 2000), demonstrando que a contração induzida pela BK, na íris de porco, envolve a participação do sistema taquicinérgico, através da ativação dos subtipos de receptores NK₁, NK₂ e NK₃.

Também, os resultados obtidos mostraram que o CGRP liberado dos neurônios sensoriais parece estar envolvido na resposta contrátil à BK, na íris de porco. Essas conclusões baseiam-se nos resultados que mostram que o antagonista, o fragmento 8-37 do CGRP, causou inibição significativa da resposta contrátil induzida pela BK, nessa preparação. O CGRP, isoladamente, é um potente vasodilatador em coelhos e também causa aumento da pressão intra-ocular, sem, no entanto, provocar miose (STONE *et al.*, 1997). Por meio de análise imuno-histoquímica, Margolis e colaboradores (1992) demonstraram a expressão do CGRP nas terminações nervosas da íris de coelho.

O envolvimento de neuropeptídeos na resposta contrátil à BK na íris isolada de porco foi ainda confirmado pelo uso da capsaicina. Essa substância deriva das plantas do gênero *Capsicum* e apresenta a capacidade de depletar neuropeptídeos das terminações nervosas (INOUE *et al.*, 1995). Estudos demonstraram que o seu uso crônico ou sua aplicação em altas doses causa dessensibilização das terminações nervosas (INOUE *et al.*, 1995; UNDEM e KOLLARIK, 2002; JIA *et al.*, 2002). Além disso, a aplicação de capsaicina na pele humana causa irritação inicial, seguida por um período refratário, durante o qual o indivíduo é relativamente

resistente à capsaicina e a outros estímulos dolorosos, fenômeno conhecido como dessensibilização de neurônios aferentes primários de pequeno diâmetro (JANCSO, 1992).

Os neurônios sensíveis à capsaicina constituem-se principalmente de fibras do tipo C não mielinizadas, que transmitem sensação dolorosa do tipo mecânica, térmica e química (HOLZER, 1988). Ainda, esses neurônios contêm neuropeptídeos, tais como a substância P, a neurocinina A e o CGRP, que são liberados das terminações nervosas após estímulo (GEPPETTI e HOLZER, 1996). Outros estudos permitiram a descoberta da capsazepina, um antagonista sintético seletivo e competitivo para os efeitos causados pela capsaicina. Em experimentos eletrofisiológicos *in vitro*, esse antagonista bloqueou o influxo de cálcio causado pela capsaicina em neurônios do gânglio da raiz dorsal de rato (OH *et al.*, 1996). A confirmação definitiva da existência de receptores vanilóides surgiu com a clonagem do receptor vanilóide tipo 1 (TRPV1), a partir do DNAc obtido do gânglio sensorial de rato, por Caterina *et al.*, (1997).

No presente estudo, para melhor explorar o envolvimento dos neuropeptídeos nas respostas contráteis induzidas pela BK na íris de porco, as preparações foram dessensibilizadas com alta concentração do agonista vanilóide, a capsaicina. Além disso, também foi utilizado o antagonista vanilóide do receptor TRPV1, a capsazepina (JIA *et al.*, 2002; PREMKUMAR e AHERN, 2000; UNDEM e KOLLARIK, 2002). Os resultados obtidos demonstraram que ambos os procedimentos farmacológicos foram capazes de inibir de forma significativa a resposta contrátil induzida pela BK na íris de porco *in vitro*, confirmando mais uma vez nossos estudos nesta preparação, que a ativação das fibras sensoriais do tipo C e a liberação de neuropeptídeos, como as neurocininas e o CGRP, participam das

respostas contráteis induzidas pela BK, nessa preparação. No entanto, Geppetti e colaboradores (1990) demonstraram que a contração induzida pela BK na íris de porco não parece envolver a liberação dos neuropeptídeos dos neurônios sensoriais em estudos *in vitro*. Os resultados do presente estudo são semelhantes aos demonstrados por Hall e colaboradores (1995), porém divergem dos dados obtidos por Geppetti e colaboradores (1990). Além disso, este estudo, no que se relaciona às ações da BK na íris de porco, confirma e estende os resultados demonstrados na íris de coelho (BUTLE e HAMMOND, 1977; UEDA *et al.*, 1982; BYNKE *et al.*, 1983; WAHLESTED *et al.*, 1985; HAKANSON *et al.*, 1987).

Analizados em conjunto, os resultados deste estudo demonstram que a resposta contrátil induzida pela BK na íris de porco é mediada pela ativação dos receptores B₂, sendo esse efeito dependente do influxo de cálcio do meio extracelular, por meio da ativação dos canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L, N e P, bem como da participação das PKA e PKC. Ainda, os dados obtidos sugerem o envolvimento da liberação neuronal de acetilcolina e de noradrenalina e também dos metabólitos derivados da via do ácido araquidônico, tais como a COX e a LOX. Finalmente, demonstrou-se que ações da BK parecem ser mediadas pela liberação de neuropeptídeos que estimulam os receptores NK₁, NK₂, NK₃, CGRP e TRPV1.

5.2 Análise dos mecanismos envolvidos na resposta contrátil induzida pelo agonista seletivo para o receptor B₁ para as cininas, a des-Arg⁹-BK, na íris isolada de porco

Com relação à presença ou não do receptor B₁ na íris de porco, os resultados deste estudo demonstraram, via emprego de agonistas e antagonistas seletivos, que

eles não estão presentes de forma constitutiva nessa preparação. No entanto, quando as preparações foram continuamente incubadas com LPS por 4h, houve um aumento expressivo da resposta funcional mediada por esses receptores, caracterizada por marcante contração induzida pela des-Arg⁹-BK na íris de porco. A indução dos receptores B₁ para as cininas tem sido descrita em várias preparações de musculatura lisa, em resposta ao dano tecidual produzido pela incubação *in vitro* ou ainda pela adição de várias substâncias inflamatórias, como citocinas e produtos bacterianos (MARCEAU *et al.*, 1998; ZUANY *et al.*, 2002; TRIANTAFILOU *et al.*, 2002; CALIXTO *et al.*, 2004). Todos esses diferentes estímulos nocivos são capazes de induzir a expressão do receptor B₁ de maneira diferenciada, tornando ainda mais complexa a compreensão dos mecanismos celulares relacionados ao controle da expressão dessa proteína (para revisão ver: MARCEAU *et al.*, 1998; CALIXTO *et al.*, 2004).

O modelo experimental deste estudo utilizou o LPS, também conhecido como endotoxina, que é um componente estrutural do lado externo da membrana de bactérias gram-negativas e um dos indutores do processo inflamatório (DEBLOIS *et al.*, 1989; McLEAN *et al.*, 1999). Um dos alvos moleculares responsáveis pela atuação do LPS no processo inflamatório são os receptores denominados *toll-like* (TLRs). Os TLRs são os responsáveis pela ativação da via de transdução de sinais pró-inflamatórios, atuando como moléculas chave que reconhecem os principais padrões moleculares associados a patogenias presentes em bactérias e vírus (BEG, 2002; AKIRA *et al.*, 2003). Os TLRs são conhecidos como uma família de receptores da imunidade inata. O primeiro membro dessa família foi descrito originalmente na *Drosophila*, inclusive com ação na atividade imune antifúngica (HASHIMOTO *et al.*, 1988; LEMAITRE *et al.*, 1996). A presença de uma região rica em leucina e de um

domínio rico em cisteína, na parte extracelular do receptor, e de uma homologia com a proteína *Toll* do receptor da IL-1, na região intracelular dele, é a característica estrutural principal de todos os TLRs conhecidos (GAY e KEITH, 1991).

Dentre os TLRs identificados, o TLR-2 reconhece componentes presentes na parede celular de bactérias gram-positivas, enquanto o TLR-4 reconhece bactérias gram-negativas, como o LPS. Embora existam, pelo menos, 10 diferentes TLRs conhecidos atualmente, os protótipos desses receptores são o TLR-4 e o TLR-2, sendo que, em humanos, o TLR-4 foi o primeiro a ser descoberto e clonado (MEDZHITOV *et al.*, 1997). A ativação desses receptores acontece após a interação do LPS com moléculas CD14, na superfície das células, o que facilita a interação com o TLR-4. Isso resulta na ativação do TLR-4 e na estimulação de uma cascata de transdução intracelular que, em última instância, leva à ativação de fatores de transcrição, estimulação da produção de citocinas e de outros agentes pró-inflamatórios (Para revisão, ver AKIRA *et al.*, 2001; ARMANT e FEENTON, 2002).

Dados recentes da literatura demonstraram que o LPS pode ativar fatores transcripcionais em diversos tipos de tecidos e sistemas, como no sistema cardiovascular de coelhos, ratos e porcos (MARCEAU *et al.*, 1998; SARDI *et al.*, 2000; JAVESGHANI *et al.*, 2003; FARMER *et al.*, 2003). Recentemente, Passos e colaboradores (2004) demonstraram que a injeção intradérmica de LPS produziu um rápido aumento do edema de pata causado pela des-Arg⁹-BK, com conseqüente indução dos receptores B₁ e influxo de neutrófilos e produção de citocinas pró-inflamatórias na pata dos animais. O mesmo efeito foi observado anteriormente, quando os animais foram tratados sistemicamente com LPS ou com o fator de agregação plaquetária (CAMPOS *et al.*, 1996; FERNANDES *et al.*, 2003). Além disso, Medeiros e colaboradores (2001) demonstraram que o tratamento de coelhos

com LPS, tanto *in vivo* como *in vitro*, produziu um aumento expressivo da resposta contrátil à des-Arg⁹-BK, na aorta isolada desses animais, logo na primeira hora após a montagem da preparação. Os resultados do presente estudo demonstraram que, 4h após a incubação da íris de porco com LPS *in vitro*, ocorre aumento expressivo da resposta contrátil induzida pelo agonista do receptor B₁ à des-Arg⁹-BK, nessa preparação. Assim, esses resultados indicam que, nessa preparação, após a incubação *in vitro* com LPS, ocorre indução funcional dos receptores do tipo B₁, em que eles não estão presentes de forma constitutiva.

Os receptores do tipo B₁ são ativados tanto pela des-Arg⁹-BK como pela Lys¹⁰-des-Arg⁹-BK (Lys-calidina), com significativa heterogeneidade nas respostas dos dois agonistas B₁, dependendo do tecido e da espécie estudados (VAVREK e STEWART, 1985; REGOLI *et al.*, 1994; STEWART *et al.*, 1999). Há também evidências indicando que as ações biológicas da Lys¹⁰-des-Arg⁹-BK são maiores do que a des-Arg⁹-BK em algumas espécies animais estudadas, mas não em todas elas. Além disso, a Lys-des-Arg⁹-BK é cerca de 10 vezes mais potente do que a des-Arg⁹-BK, na aorta de coelho, na veia umbilical humana e veia renal de porco. Por outro lado, a potência dos dois agonistas é a mesma em tecidos de cão, camundongo e *hamster* (REGOLI *et al.*, 2001). Na íris de porco, analisou-se a resposta contrátil da Lys-des-Arg⁹-BK e observou-se que não houve diferença em relação ao outro agonista do receptor B₁ testado, a des-Arg⁹-BK, tanto na eficácia quanto na potência.

Ao contrário do que foi observado para o agonista seletivo para o receptor B₁ nas preparações pré-tratadas com LPS, a resposta contrátil induzida pela BK na íris isolada de porco foi significativamente reduzida, quando comparada à sem LPS. Existem diversas evidências sugerindo que o aumento dos receptores B₁ parece

estar relacionado à redução dos receptores B₂. Alguns estudos demonstraram que a ativação crônica do receptor B₁ pode ser amplificada pelo acúmulo de des-Arg⁹-BK no sítio inflamatório, uma vez que a meia vida desse metabólito ativo da BK é de 4 a 12 vezes maior do que a da BK (DECARIE *et al.*, 1996; MARCEAU *et al.*, 1998). Em modelos experimentais, como, por exemplo, o edema de pata induzido pela carragenina, os níveis de des-Arg⁹-BK são de 1,3 a 5 vezes maiores do que os da BK. Além disso, trabalhos anteriores demonstraram que o aumento da resposta edematogênica causada por agonistas seletivos do receptor B₁ estava associado à redução do edema induzido por agonistas B₂, após o tratamento sub-agudo com LPS (CAMPOS e CALIXTO, 1995; CAMPOS *et al.*, 1995, 1996 e 2001).

A fim de caracterizar os mecanismos envolvidos na indução dos receptores B₁ na íris isolada de porco, alguns inibidores foram continuamente incubados juntamente com LPS nas preparações, os quais incluíam os inibidores da transcrição (actinomicina D e dexametasona) e da transdução (cicloheximida). Os resultados obtidos demonstraram que a presença constante desses inibidores causou um bloqueio total da resposta contrátil induzida pela des-Arg⁹-BK, sugerindo que a indução do receptor B₁ na íris isolada de porco, na presença de LPS, ocorre via síntese protéica e alterações no mecanismo de transcrição. Reforçando esses dados, também foi observado que a resposta contrátil induzida pela des-Arg⁹-BK na artéria ilíaca isolada de porco foi inibida pelo bloqueador da síntese de proteínas, a cicloheximida (PERSSON e ANDERSSON, 1998).

Os resultados deste estudo são também semelhantes aos observados em outras preparações, como na aorta isolada de coelho, veia umbilical humana e no íleo isolado de rato (DEBLOIS *et al.*, 1988, 1989; SARDI *et al.*, 1997, 1999; UENO *et al.*, 2002). Existem relatos indicando que o LPS é capaz de estimular a resposta à

des-Arg⁹-BK na aorta isolada de coelho, efeito que é significativamente inibido pela dexametasona (DEBLOIS *et al.*, 1988 e 1989). Ni e colaboradores (1998a) demonstraram, em células da musculatura lisa vascular de rato, que a dexametasona inibe a indução do receptor B₁, pelo menos em parte, por atuar na transcrição do gene desse receptor.

No presente estudo, também foram realizadas curvas concentração-resposta cumulativas para o carbacol, nessa preparação, que foram utilizadas como controle positivo dos experimentos. Os resultados demonstraram certa especificidade das ações destas drogas para o receptor B₁ das cininas, uma vez que nas mesmas concentrações as drogas utilizadas não causaram qualquer ação significativa sobre a contração induzida pelo carbacol na íris isolada de porco. Tais resultados reforçam a noção de que os receptores B₁ para as cininas são induzidos *in vitro* após tratamento com LPS, mediante mecanismos dependentes da síntese protéica (REGOLI e BARABÉ, 1980; MARCEAU *et al.*, 1998; ANGERS *et al.*, 2000, CALIXTO *et al.*, 2004).

Estudos têm demonstrado que as proteínas quinases são enzimas que constituem uma das mais importantes vias de sinalização intracelular nos animais superiores e podem estar implicadas na indução do receptor B₁ para as cininas (MARCEAU *et al.*, 1998; CALIXTO *et al.*, 2000; PRADO *et al.*, 2002; CALIXTO *et al.*, 2004). Na seqüência do presente estudo, a fim de investigar a participação de algumas proteínas quinases na indução dos receptores B₁ na íris isolada de porco, realizou-se a incubação contínua (durante 4h) com os inibidores seletivos das MAPKs, a MEK-1 (PD98059), e da p38 MAPK (SB20358). Além disso, também foi analisada a participação da fosfatidilinositol-3 quinase (LY294002). Os resultados mostraram que esses bloqueadores foram capazes de causar inibição significativa

das respostas contráteis induzidas pelo agonista do receptor B₁, a des-Arg⁹-BK, nessa preparação.

A família das MAPKs constitui um grupo de proteínas quinases cuja função e regulação são altamente conservadas (MANNING *et al.*, 2002). Essas proteínas fosforilam resíduos de serina e de treonina dos seus substratos e regulam várias atividades celulares, incluindo a expressão gênica, mitose, o movimento celular, metabolismo e a morte celular programada (JOHNSON e LAPADAT, 2002). A ativação dessa via de sinalização envolve a participação de, pelo menos, três grupos de proteínas quinases (MAPKKK ou MEKK), MAPK quinases (MAPKK ou MEK) e, finalmente, as MAPKs (ERK, JNK e p38 MAPK) (KOLCH, 2000; KYRIAKIS e AVRUCH, 2001; JOHNSON e LAPADAT, 2002; TANOUE e NISHIDA, 2003).

A ativação da ERK ocorre principalmente em resposta a estímulos mitóticos, enquanto as proteínas p38 MAPK e JNK são mais ativadas em eventos inflamatórios e infecciosos, sendo, por essa razão, também denominadas proteínas quinases ativadas por estresse (SAPK) (COHEN, 1997; KYRIAKIS e AVRUCH, 2001). A via de sinalização das MAPKs é um mecanismo que transmite sinais da membrana celular para o núcleo da célula. A ativação dessas proteínas ocorre em resposta a uma série de estímulos, dentre eles, o estresse mecânico, citocinas inflamatórias (IL-1 β e TNF α) e produtos bacterianos, além de estímulos químicos e térmicos, dentre outros (COHEN, 1997; GARRINGTON e JOHNSON, 1999; KYRIAKIS e AVRUCH, 2001).

Foi demonstrado que a ativação das proteínas quinases, incluindo a p38 MAPK e a ERK, parece regular a expressão dos receptores B₁, tanto em modelos *in vitro* quanto *in vivo* (CAMPOS *et al.*, 1999; PHAGOO *et al.*, 2001; MEDEIROS *et al.*, 2004). Larrivé e colaboradores (1998) demonstraram que o aumento da resposta

contrátil, dependente do tempo, induzida pela des-Arg⁹-BK em preparações de aorta isolada de coelho é reduzida, quando essas preparações são incubadas com inibidores da via da p38 MAPK ou da ERK. De maneira similar, Phagoo e colaboradores (2001) mostraram, por meio do ensaio de união específica (*binding*), que o inibidor da p38 MAPK, SB203580, promove redução do número de sítios de ligação específica para o agonista do receptor B₁ em cultura de fibroblastos de pulmão humano tratados com IL-1 β .

Os resultados do presente estudo confirmam e estendem essas evidências e demonstram que a indução das respostas contráteis da íris isolada de porco, após exposição ao LPS, é mediada pela ativação dos receptores B₁, um efeito que foi prevenido pela adição dos inibidores seletivos das MAPKs, o PD98059 e o SB203580 (inibidor da MEK-1 e p38 MAPK, respectivamente). Além disso, o bloqueador da fosfatidilinositol 3-quinase, o LY294002, também foi capaz de inibir significativamente a resposta contrátil induzida pela des-Arg⁹-BK, nessa preparação.

Esses resultados demonstram o envolvimento dessas quinases, de forma marcante para as MAPKs MEK-1 e p38 MAPK, no processo de indução do receptor B₁ na íris isolada de porco. Estes estudos ainda foram confirmados por meio da técnica de *Western Blot*, demonstrando que o LPS, após 5 min de incubação, nessa preparação, é capaz de induzir a fosforilação das proteínas p38 MAPK e MEK-1. Além disso, verificou-se que os inibidores dessas MAPKs foram capazes de bloquear a ativação dessas proteínas com LPS, como também demonstraram estudos anteriores na veia porta de rato, realizados por Medeiros e colaboradores (2004).

Alguns estudos *in vitro* têm sugerido o envolvimento do fator nuclear NF- κ B no processo de indução dos receptores B₁ (REGOLI e BARABÉ, 1980; MARCEAU

et al., 1998; FAUSSNER *et al.*, 1999; CALIXTO *et al.*, 2004). A via do fator de transcrição NF- κ B tem sido amplamente descrita, uma vez que ela parece estar relacionada a várias doenças, tais como a artrite reumatóide, asma, colite ulcerativa, sepse, aterosclerose e diversos tipos de câncer (MAKAROV, 2000; MARTIN *et al.*, 2000; BALDWIN, 2001; LI e VERMA, 2002; ADCOCK, 2003; SANTORO *et al.*, 2003). A ativação desse fator de transcrição observado em condições fisiológicas e patológicas está associada diretamente ao controle da expressão de várias proteínas da resposta inflamatória, incluindo citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, moléculas de adesão celular e algumas proteínas de fase aguda (BAICHWAL e BAUERLE, 1997; TAK e FIRESTEIN, 2001; LIU *et al.*, 2003).

O fator transcricional NF- κ B parece ser um componente crucial na mediação de respostas inflamatórias e alérgicas, promovendo indução de vários genes e de proteínas pró-inflamatórias, como citocinas, enzimas e receptores. Além disso, a análise da seqüência do gene para o receptor B₁ das cininas, em ratos e em humanos, revelou a presença de um sítio regulador para o fator de transcrição nuclear NF- κ B, na região promotora desse receptor (BACHVAROV *et al.*, 1996; NI *et al.*, 1998a).

Com base nesses estudos, pode-se sugerir que a indução dos receptores B₁ por LPS *in vitro* é acompanhada pela ativação do fator de transcrição NF- κ B. Outros estudos também sugerem que o NF- κ B exerce papel importante na regulação do receptor B₁ tanto *in vitro* quanto *in vivo* (CAMPOS *et al.*, 1999; PHAGOO *et al.*, 2001; SABOURIN *et al.*, 2002; SARDI *et al.*, 2002). Schanstra e colaboradores (1998) descreveram que a expressão do receptor B₁ para as cininas em cultura de fibroblastos de pulmão humano, em resposta ao tratamento com IL-1 β , é modulada transcricionalmente pela ativação da via do NF- κ B. Mais recentemente, foi

demonstrado que o inibidor da via do NF- κ B, o PDTC, reduz tanto o aumento no número de sítios de ligação específica para o agonista do receptor B₁ quanto a expressão do RNAm para esse receptor, em cultura de fibroblastos de pulmão humano, tratados com IL-1 β (PHAGOO *et al.*, 2001). Além disso, foi demonstrado que o NF- κ B parece estar amplamente envolvido no processo de indução do receptor B₁ *in vivo*, após a injeção local das citocinas IL-1 β ou TNF α (CAMPOS *et al.*, 1999), do agente quimiotático PAF (FERNANDES *et al.*, 2003) ou de LPS (PASSOS *et al.*, 2004) em patas de ratos. Mecanismo semelhante parece estar envolvido na indução do receptor B₁ na aorta de coelho (MEDEIROS *et al.*, 2001; SABOURIN *et al.*, 2002) e na veia umbilical humana (SARDI *et al.*, 2000 e 2002).

Os resultados do presente estudo indicam que o aumento da resposta contrátil para o agonista do receptor B₁, a des-Arg⁹-BK, após a adição do LPS na íris isolada de porco, envolve a ativação do NF- κ B, uma vez que essas respostas foram inibidas pelo bloqueador PDTC, uma droga conhecida por inibir a ativação do NF- κ B. Adicionalmente, por meio da técnica do ensaio de mobilidade eletroforética (EMSA), foi possível confirmar novamente os resultados obtidos com os estudos funcionais. É importante, ainda, destacar que a mesma concentração de PDTC utilizada no presente estudo não foi capaz de interferir na resposta contrátil induzida pelo carbacol, quando foi incubada juntamente com o com LPS na íris isolada de porco, demonstrando ser essa uma ação seletiva para as cininas via ativação do receptor B₁.

Os estudos realizados para caracterizar a indução dos receptores B₁ na íris de porco demonstraram que os receptores B₁ nessa preparação não são constitutivos, no entanto, a incubação do LPS por 4h é capaz de causar a indução deles. Além disso, foi também mostrado, mediante estudos funcionais, que a

indução do receptor B₁ requer a participação da síntese protéica e de fatores de transcrição, tais como do NF- κ B, da via das MAPKs, especialmente a MEK-1, p38 MAPK, além do fosfatidilinositol 3-quinase, sendo esses resultados também confirmados pelos estudos de biologia molecular.

Na seqüência dos estudos, procurou-se avançar no sentido de investigar alguns dos mecanismos que estariam envolvidos nos mecanismos transducionais do receptor B₁ após a indução com LPS na íris isolada de porco. Inicialmente, com o objetivo de analisar o perfil farmacológico do receptor B₁ após sua indução, utilizaram-se alguns antagonistas seletivos das cininas nessa preparação. Foram utilizados os antagonistas peptídicos para os receptores B₁, a des-Arg⁹-Leu⁸-BK e o R-715, além do não-peptídico, o composto benzodiazepínico-1. Os resultados obtidos demonstram que tanto os antagonistas peptídicos como o não-peptídico, para o receptor B₁, apresentaram perfil farmacológico não-competitivo. No entanto, o antagonista seletivo para o receptor B₂ (o HOE 140, 30nM) não foi capaz de modificar a resposta contrátil induzida pela des-Arg⁹-BK na íris isolada de porco.

Assim, esses resultados confirmam a presença dos receptores B₁ após a adição do LPS nessa preparação, na qual eles não são constitutivos. Além disso, também confirmam os experimentos feitos anteriormente, nos quais foi demonstrado que a adição do LPS às preparações causa redução da resposta contrátil induzida pela BK, sugerindo uma possível redução do número de receptores B₂, em função da indução do receptor B₁ pelo LPS na íris de porco.

Ainda existem estudos mostrando que alguns dos antagonistas do subtipo de receptor B₁ apresentam perfil farmacológico distinto, dependendo do tecido analisado. A des-Arg⁹-Leu⁸-BK, em algumas preparações, como, por exemplo, na artéria coronariana de porco e na bexiga urinária de coelho, apresenta perfil de

antagonista competitivo. Todavia, na musculatura longitudinal do íleo e no duodeno isolado de rato, esse antagonista B₁ apresentou perfil de agonista parcial (PRUNEAU *et al.*, 1996; BUTT *et al.*, 1995). Já o R-715 atua como antagonista seletivo para o receptor B₁ em humanos e em coelhos. Esse antagonista mostra maior resistência à degradação pelas peptidases e tem pequena atividade agonística residual em receptores B₁ do rato e do camundongo (REGOLI *et al.*, 1998).

Recentemente, um dos primeiros antagonistas não-peptídicos para os receptores B₁ das cininas foi descrito por pesquisadores da indústria farmacêutica Merck (SU *et al.*, 2003). Essas substâncias são derivadas das benzodiazepinas e demonstram alta afinidade para os receptores B₁ de humanos e de ratos, mas, ao contrário, apresentam baixa afinidade para os receptores B₁ de tecidos de cães ou de roedores. Essa classe de substância apresentou efeito antinociceptivo em modelos experimentais de dor inflamatória em coelhos, quando administrada por via oral, e também na hiperalgesia produzida pela carragenina em ratos (SU *et al.*, 2003). No entanto, até o momento, não há estudos *in vitro* demonstrando a ação dessa classe de antagonistas dos receptores B₁, com exceção do presente trabalho. Neste modelo experimental, na íris de porco, todos os antagonistas dos receptores B₁ testados demonstraram um perfil de ação de forma não competitiva, e isso talvez sugira que, nessa preparação, ocorram diferenças no sítio de ligação dessas drogas, nessa espécie animal.

Recentemente, foi demonstrada a presença do receptor B₁ também em fibras sensoriais Aδ e C no rato (WOTHERSPOON e WINTER, 2000). Além disso, a expressão do receptor B₁ em neurônios sensoriais murinos parece exercer um papel fisiológico (PESQUERO *et al.*, 2000). Neste estudo, procurou-se investigar o

envolvimento dos neuropeptídeos das fibras sensoriais nas respostas contráteis induzidas pela des-Arg⁹-BK na íris isolada de porco, mediante o uso de antagonistas seletivos para os receptores NK₁, NK₂, NK₃ e para o CGRP. Os resultados demonstrados para os receptores B₁ são contrários ao que foi evidenciado para as ações da BK atuando em receptores B₂ nessa preparação. Desse modo, os neuropeptídeos não participam da ativação dos receptores B₁, nessa preparação, portanto, conclui-se que os mecanismos de transdução relacionados à ativação dos receptores B₂ na íris de porco são distintos daqueles que regulam as respostas mediadas pela ativação dos receptores B₁.

Quando se investigou a participação dos canais de cálcio nessa preparação, por meio das curvas-concentração resposta induzidas pelo agonista do receptor B₁, a des-Arg⁹-BK, os resultados obtidos demonstraram a total dependência do cálcio externo nas respostas contráteis induzidas por esse agonista do receptor B₁ na íris isolada de porco, através dos canais de cálcio do tipo L e não do tipo N. Parte desses resultados diverge dos dados anteriores obtidos para os receptores B₂ na íris isolada de porco, pois foi demonstrado que os canais de cálcio do tipo N participam das respostas contráteis induzidas pela BK nessa preparação, no entanto, eles parecem não estar envolvidos nas ações mediadas pela ativação dos receptores B₁ na íris isolada de porco.

Os estudos de Larrivé e colaboradores (1998) mostraram que a expressão gênica dos receptores B₁ é altamente regulada e induzível por várias citocinas e MAPK. Neste trabalho, procurou-se investigar se havia também o envolvimento de algumas quinases nas respostas contráteis induzidas pela des-Arg⁹-BK, na íris isolada de porco. Os resultados da análise dos inibidores das MAPKs p38 MAPK (SB203580), MEK-1 (PD98059), fosfatidilinositol 3-quinase (LY294002) e da PKC

(GF109203X), nessa preparação, mostraram significativa inibição das respostas contráteis induzidas por esses inibidores, sinalizando o envolvimento dessas quinases na regulação funcional dos receptores B_1 na íris isolada de porco.

Analizados em conjunto, os resultados do presente estudo demonstram que a contração induzida pela BK na íris isolada de porco é mediada pela estimulação dos receptores B_2 presentes de forma constitutiva. Além disso, a ativação do receptor B_2 pela BK na íris causa a liberação neuronal de acetilcolina, noradrenalina e neuropeptídeos atuando em receptores NK_1 , NK_2 , NK_3 e de CGRP. Finalmente, foi também demonstrado que os derivados do ácido araquidônico, pela via da COX-1, COX-2, metabólitos derivados de lipoxigenase, bem como o TXA_2 , exercem papel importante na mediação da resposta contrátil à BK. Por outro lado, foi observado o influxo de cálcio do meio extracelular, por meio dos canais de cálcio do tipo L, N e P, bem como a possível participação das PKA e PKC mediando as ações da BK nessa preparação.

Com relação aos receptores B_1 , os resultados mostraram que eles não estão presentes de forma constitutiva na íris de porco. No entanto, o tratamento das preparações durante 4 h com LPS causou indução dependente do tempo do receptor B_1 na íris isolada de porco. Esse processo envolve mecanismos dependentes da síntese protéica, além de fatores de transcrição nuclear, como o NF- κ B. A via das MAPKs, especialmente a MEK-1 e p38 MAPK, além da fosfatidilinositol 3-quinase, participa de forma importante na indução dos receptores B_1 , após a incubação com LPS.

Finalmente, demonstrou-se que os neuropeptídeos atuando nos receptores NK_1 , NK_2 , NK_3 e CGRP não parecem participar dos mecanismos envolvidos nas respostas contráteis induzidas pelo agonista do receptor B_1 , a des-Arg⁹-BK, nessa

preparação, porém, eles apresentam uma significativa dependência do cálcio extracelular, através dos canais de cálcio do tipo L e não do tipo N. Os resultados apresentados neste trabalho fornecem evidências farmacológicas e moleculares, indicando que os mecanismos que regulam as ações dos receptores B₁ após a indução com LPS são distintos dos observados com os receptores B₂.

As cininas têm sido descritas como um grupo importante de mediadores da inflamação e da dor, que apresenta papel fundamental em vários processos fisiopatológicos. O presente trabalho demonstrou, por meio de diferentes técnicas funcionais e moleculares, o envolvimento de algumas vias de sinalização intracelular na indução e na regulação da expressão dos receptores B₁ das cininas, bem como dos receptores B₂, na íris isolada de porco. Esses resultados possibilitam melhor compreensão de alguns dos mecanismos envolvidos no sistema das cininas, nessa espécie animal. Além disso, o trabalho contribuirá para o desenvolvimento de terapias antiinflamatórias e analgésicas mais eficientes para tratamento de processos inflamatórios e dolorosos crônicos.

6. RESUMO E CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou através de técnicas farmacológicas e de biologia molecular que:

1. A resposta contrátil induzida pela BK na íris isolada de porco é mediada pelos receptores B_2 constitutivos e não os receptores B_1 . Além disso, envolve a liberação neuronal de ACh e NOR, e da ativação de canais de sódio sensíveis a tetrodotoxina.
2. A contração induzida pela BK na íris de porco é mediadas pelos metabólitos derivados do ácido araquidônico através da COX-1, COX-2, TXA_2 e LTD_4 .
3. Os estudos também demonstram que a contração da BK na íris de porco *in vitro* é mediada pela ativação das fibras sensoriais do tipo C, e da liberação de neuropeptídeos atuando em receptores NK_1 , NK_2 , NK_3 e CGRP.
4. A resposta contrátil induzida pela BK na íris isolada de porco, é dependente do influxo de cálcio do meio extracelular e da ativação dos canais de cálcio do tipo L, N e P, além da participação das PKA e PKC.
5. Os resultados mostraram que na íris isolada de porco os receptores B_1 não são constitutivos, mas podem ser induzidos pela exposição das preparações com LPS, sendo que a indução desses receptores ocorre de forma tempo-dependente.
6. Na íris isolada de porco, a indução dos receptores B_1 ocorre pela exposição das preparações com LPS, através de mecanismos dependentes da síntese protéica, sendo mediada pela ativação pela ativação do NF- κ B e das MAPK (p38, MEK-1) e PI-3K.
7. Os resultados demonstraram que as respostas contráteis induzidas pela des-Arg⁹-BK na íris de porco, parece ter o envolvimento dos metabólitos derivados do

ácido araquidônico através da COX-1 e COX-2, LTD₄ e TXA₂, sendo estes mecanismos semelhantes aos observados para para os receptores B₂

8. No entanto, a resposta contrátil da des-Arg⁹-BK não parece ser mediada pela liberação dos neuropeptídeos (NK₁, NK₂, NK₃ e CGRP), estes resultados são contrários aos observados para os receptores B₂.
9. As respostas contráteis induzidas pela des-Arg⁹-BK na íris de porco, é dependente do influxo de cálcio do meio extracelular e da ativação de canais de cálcio do tipo L. De forma similar estes resultados também foram observados para o agonista do receptor B₂ das cininas a BK.
10. Além disso, as respostas contráteis induzidas pela des-Arg⁹-BK não parece envolver a ativação dos canais de cálcio do tipo N, sendo estes resultados contrários aos observados para os receptores B₂.
11. No entanto, resultados semelhantes foram observados para os receptores B₁ e B₂, com relação ao envolvimento das MAPK (MEK-1, p38 MAPK), bem como da PKC e PI-3K, mediando as ações de ambos os receptores na íris isolada de porco.
12. Os resultados em conjunto contribuem para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no sistema das cininas na íris de porco, possibilitando o desenvolvimento de terapias mais eficientes para o tratamento dos processos inflamatórios e dolorosos.

7. TRABALHOS PUBLICADOS

1. El Sayah, M.; Calixto, J. B. Study of the mechanisms involved in the bradykinin-induced contraction of the pig iris sphincter muscle in vitro. **Eur. J. Pharmacol.** 458: 175 – 181, 2003
2. El Sayah, M.; Calixto, J. B. New Evidence on the mechanisms underlying bradykinin-mediated contraction of the pig iris sphincter in vitro. **Peptides**. 24:1045 – 1051, 2003.

8. REFERÊNCIAS

- ADCOCK, I.M. Glucocorticoids: new mechanisms and future agents. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 3:249-257, 2003.
- AHLUWALIA, A., PERRETI, M. B₁ receptors as new inflammatory target. Could this B be the 1? *Trends in Pharmacol. Sci.*, 20:100-104, 1999.
- AKHTAR, R. A.; HONKANEN, R. E.; HOWE, P.H.; ABDEL-LATIF, A. A. M2-muscarinic receptor subtype is associated with inositol trisphosphate accumulation, myosin light chain phosphorylation and contraction in sphincter smooth muscle of rabbit iris. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 243:624-632, 1987.
- AKIRA, S.; TAKEDA, K.; KISHO, T. Toll-like receptors: critical protein linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.* 2:675-680, 2001.
- ALLOGHO, S.N., GOBEIL, F., PHENG, L.H., NGUYEN-Le, X.K., NEUGEBAUER, W., REGOLI, D. Kinin B₁ and B₂ receptors in the mouse. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 73:1759-1764, 1995.
- AMMERER, S., BRAUN, A., ARNOLD, ROSCHER, A. A. The human bradykinin B₂ receptor gene: full length cDNA, genomic organization and identification of the regulatory region. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 211:226-233, 1995.
- ANGERS, M., DROUIN, R., BACHVAROVA, M., PARADIS, I., MARCEAU, F., BACHVAROV, D.R. In vivo protein-DNA interactions at the kinin B(1) receptor gene promoter: no modification on interleukin-1 beta or lipopolysaccharide induction. *J. Cell Biochem.*, 78:278-296, 2000.
- ARAÚJO, R.C., KETTRITZ, R., FICHTNER, I., PAIVA, A.C.M., PESQUERO, J.B., BADER, M. Altered neutrophil homeostasis in kinin B₁ receptor-deficient mice. *Nat. Chem.*, 382:91-95, 2001.
- ARMANT, M.A., FENTON, M.J. Toll-like receptors: a family of pattern-recognition receptors in mammals. *Genome Biol.* 3:3011, 2002.
- ASANO, M., HATORI, C., SAWAI, H., JOHKEI, S., INAMURA, N., KAYAKIRI, H., ABE, Y., INOUE, T., SAWADA, Y., MIZUTANI, T., OKU, T., NAKAHARA, K. Pharmacological characterization of a nonpeptide bradykinin receptor antagonist, FR165649, and agonist, FR190997. *Br. J. Pharmacol.*, 124:441-446, 1998.
- AUDET, R., PETICLER, E., DRAPEAU, G., RIOUX, F., MARCEAU, F. Further analysis of the up-regulation of bradykinin B1 receptors in isolated rabbit aorta by using metabolic inhibitors. *Eur. J. Pharmacol.*, 271:551-555, 1994.
- AUSTIN, C.E.; FAUSSNER, A.; ROBINSON, H.E.; CHAKRAVARTY, S.; KYLE, D.J.; BATHON, J.M.; PROUD, D. Stable expression of the human kinin B1 receptor in Chinese hamster ovary cells. Characterization of ligand binding and effector pathways. *J. Biol. Chem.*, 272, 11420-11425, 1997.
- AYOUB, S.S., BOTTING, R.M., GOORHA, S., COLVILLE-NASH, P.R., WILLOUGHBY, D.A., BALLOU, L.R. Acetaminophen-induced hypothermia in mice is mediated by a prostaglandin endoperoxide synthase 1 gene-derived protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 11165-11169, 2004.
- BACHVAROV, D.R., HESS, J.F., MENKE, J.G., LARRIVÉE, J.F., MARCEAU, F. Structure and genomic organisation of the human B1 receptor gene for kinins (BDKRB1). *Genomics*, 33:374-381, 1996.
- BACHVAROV, D.R.; SAINT-JACQUES, E.; LARRIVÉE, J.F.; LEVESQUE, L.; RIOUX, F.; DRAPEAU, G.; MARCEAU, F. Cloning and pharmacological characterization of the rabbit bradykinin B2 receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 275, 1623-1630, 1995.

- BAICHWAL, V.R.; BAEUERLE, P. A. Activate NF-kappa B or die? *Curr. Biol.* 7: R94-96, 1997.
- BAKHLE, Y.S.; BELL, C. Increased numbers of substance P-containing sensory neurons in a rat strain with a genetic neurotrophic defect. *Neuropeptides*, 27: 169-174, 1994.
- BALDWIN JR, A.S. The transcription factor NF-kB and human diseases. *J. Clin. Invest.* 107: 3-6, 2001.
- BATHON, J., PROUD, D. Bradykinin antagonists. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 31, 129-162, 1991.
- BAYLOR, D. How photons start vision. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:560-568, 1996.
- BECKERS, H.J.; KLOOSTER, J.; VRENSE, G.F.; LAMERS, W.P. Substance P in rat corneal and iridal nerves: an ultrastructural immunohistochemical study. *Ophthalmic. Res.* 25:192-200, 1993.
- BERALDO, W.T.; ANDRADE, S.P. Discovery of bradykinin and the kallikrein-kinin system. In: Farmer SG (Ed.). *The Handbook of Immunopharmacology. The kinin system*. Londres: Academic Press, 1-8.1997.
- BERKOWITZ, B.A.; WILSON, C.A.; TOFTS, P.S.; PESHOCK, R.M. Effect of vitreous fluidity on the measurement of blood-retinal barrier permeability using contrast-enhanced MR1. *Magn Reson Med.* 31: 61-66, 1994.
- BERRIDGE, M.J. Inositol trisphosphate and calcium signaling. *Nature*, 361:315, 1993.
- BERTOLINI, A, OTTANI, A, SANDRINI, M. Dual acting anti-inflammatory drugs: a reappraisal. *Pharmacol. Res.* 44:437-450, 2001.
- BHoola, K.D., FIGUEROA, C.D.; WORTHY, K. Bioregulation of kinins: Kallikreins, kininogens and kininases. *Pharmacol. Rev.*, 44:1-80, 1992.
- BIZRI-EL, N., BKHAILY, G.E, WANG, S, JACQUES, D., REGOLI, D., D'ORLEANS-JUSTE SUKARIEH, R. Bradykinin induced a positive chronotropic effect via stimulation of T- and L-type calcium currents in heart cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 81: 247-258, 2003.
- BLAIS, JR., C., MARCEAU, F., ROULEAU, J.L., ADAM, A. The kallikrein-kininogen-kinin system: lessons from the quantification of endogenous kinins. *Peptides*, 21:1903-1940, 2000.
- BLAUKAT, S.; DIKIC, I. Activation of sphingosine kinase by the bradykinin B2 receptor and its implication in regulation of the ERK/MAP kinase pathway. *Biol. Chem.* 382: 135-139, 2001.
- BOISSONAS, R.A., GUTTMANN, S., JAQUENOUD, P.A. Synthese de la L-arginyl-L-propyl-L-propyl-glycyl-L-phénylalaninyl-L- arginine, un nonapeptide présentant les propriétés de la bradykinine. *Helv. Chim. Acta*, 43:1349-1358, 1960.
- BONNER, T.I.; BUCKLEY, N.J.; YOUNG, A.C.; BRANN, M.R. Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science*, 237:527-532, 1987.
- BONNER, T.I.; YOUNG, A.C.; BRANN, M.R.; BUCKLEY, N.J. Cloning and expression of the human and rat M₅ muscarinic acetylcholine receptor genes. *Neuron*. 1:403-410, 1988.
- BORKOWSKI, J.A., RANSON, R.W., SEABROOK, E.R., TRUMBAUER, M., CHEN, H., HILL, R.E., STRADER, C.D., HESS, J.F. Target disruption of bradykinin B2 receptor gene eliminates bradykinin action in smooth muscles and neurons. *J. Biol. Chem.*, 270:13170, 1995.
- BOTTING, R. COX-1 and COX-3 inhibitors. *Thromb Res.* 110:269-272, 2003.

- BOUTHILIER, J.; DEBLOIS, D.; MARCEAU, F. Studies on the induction of pharmacologic responses to des-Arg⁹-bradykinin *in vitro* and *in vivo*. Br. J. Pharmacol., 92, 257-263, 1987.
- BOYCE, S., RUPNIAK, N.M.J., CARLSON, E.J., WEBB, J., BORKOWSKI, J.A., HESS, J.F., STRADER, C.D., HILL, R.G. Nociception and inflammatory hyperalgesia in B₂ kinin receptor knockout mice. Immunopharmacology, 33:333-335, 1996.
- BURGESS, G.M.; PERKINS, M.N.; RANG, H.P., CAMOBELL, E.A.; BROWN, M.C.; MCINTYRE, P. URBAN, L.; DZIADULEWCZ, E.K.; RITCHIE, T.J.; HALLET, A.; SNELL, C.R.; WRIGLESWORTH, R.; LEE, W.; DAVIS, C.; PHAGOO, S.B.; DAVIS, A.J.; PHILLIPS, E.; DRAKE, G.S.; HUGHES, G.A; DUNSTAN, A.; BLOOMFIELD, G.C. Bradyzide, a potent non-peptide receptor antagonist with long-lasting oral activity in animal models of inflammatory hyperalgesia. Br. J. Pharmacol. 129: 77-86, 2000.
- BUTLER, J.M.; HAMMOND, B. Neurogenic responses of the eye to injury. Effect of sensory denervation on the response of the rabbit eye to bradykinin and prostaglandin E₁. Trans. Ophthalmol. Soc. U. K., 97:668-674, 1977.
- BUTLER, J.M.; HAMMOND, B. The effects of sensory denervation on the responses of the rabbit eye to prostaglandin E₁, bradykinin and substance P. Br. J. Pharmacol., 69:495-502, 1980.
- BUTT, S.K., DAWSON, LG., HALL, J.M. Bradykinin B₁ receptors in the rabbit urinary bladder: induction of responses, smooth muscle contraction, and phosphatidylinositol hydrolysis. 114:612-617, 1995.
- BYLUND, D.B.; EIKENBERG, D.C.; HIEBLE, J.P.; LANGER, S.Z.; LEFKOWITZ, R.J.; MINNEMAN, K.P.; MOLINOFF, P.B.; RUFFOLO, R.R.; TRENDELENBURG, U. Jr. International Union of Pharmacology Nomenclature of adrenoceptors. Pharmacol. Rev.46:121-136, 1994.
- BYNKE, G.; HAKANSON, R.; HÖRIG, J.; LEANDER, S. Bradykinin contracts the pupillary sphincter and evokes ocular inflammation through release of neuronal substance P. Eur. J. Pharmacol., 91: 469-475, 1983.
- CABRINI, D.A., KYLE, D.J., CALIXTO, J.B. A pharmacological analysis of receptor subtypes and the mechanisms mediating the biphasic response induced by kinins in the rat stomach fundus *in vitro*. J. Pharmacol. Exp.Ther. 277, 299-307, 1996.
- CALIXTO, J.B., CABRINI, D.A., FERREIRA, J., CAMPOS, M.M. Kinins in pain and inflammation. Pain. 87, 1-5, 2000.
- CALIXTO, J.B., CABRINI, D.A., FERREIRA, J., CAMPOS, M.M. Inflammatory pain: Kinins and antagonists. Cur.Op.Anesthes. 14, 519-526, 2001.
- CALIXTO, J.B., MEDEIROS, R., FERNANDES, E.S., FERREIRA, J., CABRINI, D.A, CAMPOS, M.M. Kinin B₁ receptors: Key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. Br. J. Pharmacol. 2004, In press.
- CAMPOS, A.H., CALIXTO, J.B. Mechanisms involved in the contractile responses of kinins in rat portal vein rings: mediation by B₁ and B₂ receptors. J. Pharmacol. Exp. Ther. 268:902-909, 1994.
- CAMPOS, M.M., CALIXTO, J.B. Involvement of B₁ and B₂ receptors in bradykinin-induced rat paw oedema. Br. J. Pharmacol., 114, 1005-1013, 1995.
- CAMPOS, M.M., CALIXTO, J.B. Neurokinin mediation of oedema and inflammation. Neuropeptides. 34, 314-322, 2000.
- CAMPOS, M.M.; CABRINI, D.A., CARDOZO, A. M.; ERA, G.A.; CALIXTO, J.B. Changes in paw oedema triggered via bradykinin B₁ and B₂ receptors in streptozotocin-diabetic rats. Eur. J. Pharmacol. 416: 169-177, 2001.

- CAMPOS, M.M.; MATA, L.V.; CALIXTO, J.B. Expression of B₁ receptors mediating paw oedema and formalin induced-nociception. Modulation by glucocorticoids. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 73: 812-819, 1995.
- CAMPOS, M.M.; SOUZA, G.E.P.; CALIXTO, J.B. *In vivo* B₁ kinin-receptor up-regulation. Evidence for involvement of protein kinases and nuclear factor- κ B pathways. *Br. J. Pharmacol.* 127: 1851-1859, 1999.
- CAMPOS, M.M.; SOUZA, G.E.P.; CALIXTO, J.B. Up-regulation of B₁ mediating des-Arg⁹-BK-induced rat paw oedema by systemic treatment with bacterial endotoxin. *Br. J. Pharmacol.*, 117, 793-798, 1996.
- CARL, A., LEE, H.K., SANDERS, K.M. Regulation of ion channels in smooth muscles by calcium. *Am. J. Physiol.* 271:40-49, 1996.
- CATERINA, M.J., SCHUMACHER, M.A, TOMINAGA, M., ROSEN, T.A, LEVINE, J.D., JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389:816-824, 1997.
- CHAI, K.X., NI, A., WANG, D., WARD, D.C., CHAO, J., CHAO, L. Genomic DNA sequence, expression and chromosomal localisation of the human of the human B₁ bradykinin receptor gene BDKRB₁. *Genomics*, 31:51-57, 1996.
- CHANDRASEKHARAN, N.V., DAÍ, H, ROOS, K.L., EVANSON, N.K., TOMSIK, J., ELTON, T.S., SIMMONS, D.L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs:cloning, structure, and expression. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 99:13926-13931, 2002.
- CHOPPIN, A.; EGLIN, R.M.; HEGDE, S.S. Pharmacological characterization of muscarinic receptors in rabbit isolated iris sphincter muscle and urinary bladder smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 124:883-888, 1998.
- CLARK, A F., YORIO, T. Ophthalmic drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2:448-459, 2003.
- COHEN, D.M. Mitogen-activated protein kinase cascades and the signaling of hyperosmotic stress to immediate early genes. *Comp. Biochem. Physiol.* 117:291-299, 1997.
- COLE, D.F., UNGER, W.G. Action of bradykinin on intraocular pressure and pupillary diameter. *Ophthalmic. Res.* 6, 308-314, 1974.
- DAMM, J.; RAU, T.; MAIHOFNER, C.;PAHL, A.; BRUNE, K. Constitutive expression and localization of COX-1 and COX-2 rabbit iris and ciliary body. *Exp. Eye. Res.* 72: 611-621, 2001.
- DAVIES, P. J., IRELAND, D.R., McLACHLAN, E.M. Sources of Ca^{2+} - activated K⁺ conductar in neurones of the rat superior cervical ganglion. 495: 353-366, 1996.
- DAVIES, S.P.; REDDY. H.; CAIVANO, M.; COHEN, P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J.*, 351: 95-105, 2000.
- De SCHUTTER, E., BOWER, J.M. Na active membrane model of the cerebellar Purkinje cell. I. simulation of current clamps in slice. *J. Neurophysiol.* 71: 375-400, 1994.
- DEBLOIS, D.; BOUTHILLIER, J.; MARCEAU, F. Effect of glucocorticoids, monokines and growth factor on the spontaneously developing responses of the rabbit isolated aorta to des-Arg⁹-bradykinin. *Br. J. Pharmacol.* 93: 969-977, 1988.
- DEBLOIS, D.; BOUTHILLIER, J.; MARCEAU, F. Pharmacological modulation of the up-regulation responses to des-Arg⁹-bradykinin *in vivo* and *in vitro*. *Immunopharmacol.*, 17, 187-198, 1989.

- DEBLOIS, D.; BOUTHILLIER, J.; MARCEAU, F. Pulse exposure to protein synthesis inhibitors enhances vascular responses to des-Arg9-bradykinin: possible role of interleukin-1. *Br. J. Pharmacol.*, 103, 1057-1066, 1991.
- DECARIE, A., RAYMOND, P., GERVAIS, N., COUTURE, R., ADAM, A. Serum interspecies differences in metabolic pathways of bradykinin and [des-Arg9]BK: influence of enalaprilat. *Am. J. physiol.* 271:1340-1347, 1996.
- DENDORFER, A., WOLFRUM, S., DOMINIAK, P. Pharmacology and cardiovascular implications of the kinin-kallikrein system. *Jpn. J. Pharmacol.*, 79:403-426, 1999.
- DINARELLO, C. A. Proinflammatory cytokines, *Chest*. 118: 503 - 508, 2000.
- DRAY, A. Kinins and their receptors in hyperalgesia. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75:704-712, 1997.
- DRAY, A., PERKINS, M. Bradykinin and inflammatory pain. *Trends Neurosci.* 16:99-104, 1993
- DUNLAP, K., LUEBKE, J.I., TURNER, T.J. Exocytotic Ca^{2+} channels in mamalian central neurons. *Trends. Neurosci.*, 18, 89-98, 1995.
- EGLIN, R.M.; HEGDE, S.S.; WATSON, N. Muscarinic receptor subtypes and smooth muscle function. *Pharmacol. Rev.* 48:531-536, 1996.
- EVERITT, C.M.; HALL, J.M., MITCHELL, D., MORTON, I.K. Contrasting properties of bradykinin receptor subtypes mediating contractions of the rabbit and pig isolated iris sphincter pupillae preparation. *Agents Actions Suppl.*, 38:378-381, 1992.
- FARMER, M.R.; ROBERTS, R.E.; GARDIER, S.M.; RALEVIC, V. Effects of in vivo lipopolysaccharide infusion on vasoconstrictor function of rat isolated mesentery, kidney and aorta. *J. Pharmacol Exp. Ther.* 306:538-545, 2003.
- FAUSSNER, A.; BATHON, J.M.; PROUD, D. Comparison of the responses of B_1 and B_2 kinin receptors to agonist stimulation. *Immunopharmacol.*, 45, 13-20, 1999.
- FELETON, M., GERMAIN, M., THURIEAU, C., FAUCHERE, J.L., CANET, E. Agonistic and antagonistic properties of the bradykinin B_2 receptor antagonist, HOE 140, in isolated blood vessels from different species. *Br. J. Pharmacol.* 112: 683-689, 1994
- FELETON, M., MARTIN, C.A., MOLIMARD, M., NALINE, E., GERMAIN, M., FAUCHERE, J.L., CANET, E., ADVENIER, C. In vitro effects of HOE 140 in human bronchial and vascular tissue. *Eur. J. Pharmacol.* 274:57-64, 1995.
- FERNANDES, E.S., PASSOS, G.F., CAMPOS, M.M., ARAÚJO, J.G., PESQUERO, J.L., AVELLAR, M.C., TEIXEIA, M.M., CALIXTO, J.B. Mechanisms underlying the modulatory action of platelet activating factor (PAF) on the upregulation of kinin B_1 receptors in the rat paw. *Br. J. Pharmacol.*, 139:973-981, 2003.
- FRANK, R.N. Potential new medical therapies for diabetic retinopathy: protein kinase C inhibitors. *Am. J. Ophtalmology.*, 133: 693-698, 2002.
- FREY, E.K. Zusammenhänge zwischen Herzarbeit und Nierentätigkeit. *Arch. Klin. Chir.*, 142:633-669, 1926.
- GABRA, B.H., COUTURE, R., SIROIS, P. Functional duality of kinin receptors in pathophysiology. *Med. Sci (Paris)*, 19:1101-111-, 2003.
- GARRINGTON, T.P.; JOHNSON, G.L. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signalling pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11:211-218, 1999.
- GAY, N.J., KEITH, F.J. *Drosophila* toll and IL-1 receptor. *Nature*, 351:355-356, 1991.
- GEPPETTI, P., PATACCINE, R., CECCONI, R., TRAMONTANA, M., MEINI, S., ROMANI, A., NARDI, M. and MAGI, C.A. Effects of capsaicin, tachykinins, calcitonin-gene-related peptide and bradykinin in the pig iris sphincter muscle. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 341, 301-307, 1990.

- GIL, D.M.; KRAUSS, H.A.; BOGARDUS, A.M. Muscarinic receptor subtypes in human iris-ciliary body measured by immunoprecipitation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38:1434-1442, 1997.
- GILBERT, C.D., WIESEL, T.N. Receptive field dynamics in adult primary visual cortex. *Nature*, 356:150-159, 1992.
- GOUGAT, J., FERRARI, B., SARRAN, L., PLANCHENAU, C., PONCELET, M., MARUAN ALONSO, R., CUDENNEC, A., CROCI, T., GUAGNINI, F., URBAN-SZBO, K., MARTIR, J.P., SOUBRIE, P., FINANCE, O., Le FUR, G. SSR240612 [(2R)-2-[(3R)-3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-3-[(6-methoxy-2-naphthyl)sulfonyl]amino]propanoyl]amino-3-(4-{[2R,6S]-2,6-diamethylpiperidin-1-yl}methyl)phenyl]-n-isopropyl methylpropanamide hydrochloride], a new nonpeptide antagonist of the bradykinin B₁ receptor: biochemical and pharmacological characterization. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 309, 661-669, 2004.
- GREENBERG, D.A. Calcium channel in neurological disease. *Annals of Neurology*, 42, 275-282, 1997.
- GEPPETTI, P., HOLZER, P. *Neurogenic Inflammation*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1996.
- GRIESBACHER, T., AMANN, R., SAMETZ, W., DIETHART, S., JUAN, H. The nonpeptide B₂ receptor antagonist FR173657: inhibition effects of bradykinin related to its role in nociception. *Br. J. Pharmacol.* 124: 1328-1334, 1998.
- GRIESBACHER, T., LEMBECK, F. Analysis of the antagonistic actions of HOE 140 and other novel bradykinin analogues on the guinea-pig ileum. *Eur. J. Pharmacol.* 211, 393-398, 1992.
- GRIESBACHER, T., SAMETZ, W., LEGAT, F.J., DIETHART, S., HAMMER, S., JUAN, H. Effects of the non-peptide B₂ antagonist FR173657 on kinin-induced smooth muscle contraction and relaxation, vasoconstriction and prostaglandin release. *Br. J. Pharmacol.* 121:469-476, 1997.
- GRIESBACHER, T.; LEGAT, F.J. Effects of the non-peptide B₂ receptor antagonist FR17365 in models of visceral and cutaneous inflammation. *Inflamm. Res.* 49:535-540, 2000.
- GRUMANN-JÚNIOR, A.; DIAS, M.A.; ALVES, R.V.; BOTEON, J.E.; CALIXTO, J.B. Mechanisms mediating substance P-induced contraction in the rat iris *in vitro*. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 41: 1861-1870, 2000.
- HADDAD, E.B., FOX, A.J., ROUSELL, J., BURGESS, G., MCINTYRE, P., BARNES, P.J., CHUNG, K.F. Post-transcriptional regulation of bradykinin B₁ and B₂ receptor gene expression in human lung fibroblasts by tumor necrosis factor α . *Mol. Pharmacol.* 57:1123-1131, 2000.
- HAGAN, J.J.; VAN DER HEIJDEN, B.; BROEKKAMP, C.L. The relative potencies of cholinomimetics and muscarinic antagonists on the rat iris *in vivo*: effects of pH on potency of pirenzepine and telenzepine. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 338:476-478, 1988.
- HAKANSON, R.; BEDING, B.; EKMAN, R.; HEILIG, M.; WAHLESTED, C.; SUNDLER, F. Multiple tachykinin pools in sensory nerve fibres in the rabbit iris. *Neuroscience*, 21:943-950, 1987.
- HALL, J.M. Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles. *Pharmacol. Ther.*, 56, 131-190, 1992.
- HALL, J.M., FIGINI, M., BUTT, S.K., GEPPETTI, P. Inhibition of bradykinin-evoked trigeminal nerve stimulation by the non-peptide bradykinin B₂ receptor antagonist WIN 64338 *in vivo* and *in vitro*. *Br. J. Pharmacol.* 116, 3164-3168, 1995.

- HALL, J.M.; MITCHELL, D.; MORTON, I.K. Tachykinin receptors mediating responses to sensory nerve stimulation and exogenous tachykinins and analogues in the rabbit isolated iris sphincter. *Br. J. Pharmacol.*, 109: 1008-1013, 1993.
- HALL, J.M.; MORTON, I.K.M. The pharmacology and immunopharmacology of kinin receptors. In *The kinin System*. Farmer, S.G. Ed. Academic Press, 9 – 43, 1997.
- HALLE, S., GOBEIL, F. Jr., OUELLETTE, J., LAMBERT, C., REGOLI, D. In vitro and in vivo effects of kinin B₁ and B₂ receptor agonists and antagonists in inbred control and cardiomyopathic hamsters. *Br. J. Pharmacol.*, 129: 1641-1648, 2000.
- HARRISON, R.; KAUFMANN, C.S. Clonidine effects of a topically administered solution on intraocular pressure and blood pressure in open-angle glaucoma. *Arch. Ophthalmol.* 95: 1368-1373, 1977.
- HARUNO, I.; YOSHITOMI, T.; HARADA, Y.; KATORI, M.; ISHIKAWA, S. Calcitonin gene-related peptide induced relaxation of the rabbit iris dilatator muscle. *Cur. Eye Res.* 105 –110, 1995.
- HASHIMOTO, C., HUDSON, K.L., ANDERSON, K.V. The toll gene of drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appaears to encode a transmembrane protein. *Cell*, 52:269-279, 1988.
- HEADY, T.N.; GOMORA, J.C.; MCDONALD, T.L.; PEREZ-REYS, E. Molecular Pharmacology of T-type Ca²⁺ Channels. *Jpn. J. Pharmacol.* 85: 339 – 350, 2001.
- HESS, J., F., BORKOWSKI, J.A., YOUNG, G.S., STRADER, C.D., RANSON, R.W. Cloning and pharmacological characterization of human bradykinin (BK-2) receptor. *Biochem., Res. Commun.*, 184:260-268, 1992.
- HESS, J.F. Molecular pharmacology of kinin receptors. In: FARMER, S.G. (Ed), *The Kinin System*, London: Academic Press, p. 45-55, 1997.
- HESS, J.F., HEY, P.J., CHEN T.B., PETTIBONE, D.J., CHANG, R.S. Molecular and pharmacological diversity of the kinin B₁ receptor. *Int. Immunopharmacol.*, 2:1747-1754, 2002.
- HESS, J.F.; HEY, P.J.; CHEN, T.B.; O'BRIEN, J.; OMALLEY, S.S.; PETTIBONE, D.J.; CHANG, R.S.L. Molecular cloning and pharmacological characterization of the canine B₁ and B₂ bradykinin receptors. *Biol. Chem.* 382: 123-129, 2001.
- HOCK, F.J.; WIRTH, K.; ALBUS, U.; LINZ, W.; GERHARDS, H.J.; WIEMER, G.; HENKE, S.; BREIPOHL, G.; KONING, W.; KNOLLE, J. Hoe 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist: *in vitro* studies. *Br. J. Pharmacol.*, 102, 769-773, 1991.
- HOLZER, P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience*, 24:739-768, 1988.
- HUANG, Y., GIL, D.W., VANSCHEEUWIJCK, P. STAMER, W.D., REGAN, J.W. Localization of alpha 2-adrenergic receptor subtypes in the anterior segment of the human eye with selective antibodies. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 36:2729-2739, 1995.
- HUGUENARD, J.R. Low-voltage-activated (T-type) calcium-channel genes identified. *Trends Neurosc.*, 21, 451-452, 1998.
- IGIC, R. Kallikrein and kininases in ocular tissues. *Exp. Eye Res.* 41, 117-120, 1985.
- JANCSO, G. Pathobiological reactions of C-fibre primary sensory neurones to peripheral nerve injury. *Exp. Physiol.* 77:405-431, 1992.
- JAVESGHANI, D.; JUSSAIN, S.N.; SCHEIDEL, J.; QUINN, M.T.; MAGDER, S.A. Superoxide production in the vasculature of lipopolysaccharide treated rats and pigs. *Schock*, 19:486-493, 2003.

- JIA, Y.; McLEOD, R.L.; WANG, X.; PARRA, L.E.; EGAN, R.W.; HEY, J.A. Anandamide induces cough in conscious guinea-pigs through VR1 receptors. *Br. J. Pharmacol.*, 137:831-836, 2002.
- JOHNSON, G.L.; LAPADAT, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Cience*, 298:1911-1912, 2002.
- JONES, R.M.; BULAJ, G. Conotoxins – New vista for peptide therapeutic. *Curr. Pharmaceut. Des.* 6: 1249-1285, 2000.
- KATZ, E.; PROTTI, D.A.; FERRO, P.A.; SIRI, M.D.R.; UCHITEL, O. D. Effects of Ca^{+2} channel blocker neurotoxins on transmitter release and presynaptic currents at mouse neuromuscular junction. *Br. J. Pharmacol.* 121: 1531-1540, 1997.
- KERNELL, D. Principles of force gradation in skeletal muscles. *Neural Plast.* 10: 69-76, 2003.
- KING, K.L.; DELAMERE, N.A.; CSAKAS, S.C.; PIERCE, W.M. Metabolism of arachidonic acid by isolated rabbit ciliary epithelium. *Exp. Eye. Res.* 55: 235-241, 1992.
- KOLCH,W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem. J.* 351:289-305, 2000.
- KRAUT, H., FREY, E.K., WERLE, E. Der Nachweis eines Krieslaufhomons in der pankreasdrüse. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol., Chem.*, 189:97-106, 1930.
- KYRIAKIS, J.M., AVRUCH, J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol. Ver.* 81:807-869, 2001.
- LAUDANNO, O M., SAN MIGUEL, P., ARAMBERY, L.J., CESOLARI, J.A. Mechanism of inhibition of COX-2 and COX-3 in gastrointestinal damage induced by NSAID in rats. *Acta Gastroenterol Latinoam.* 33:183-185, 2003.
- LECCHINI, S.; MARCOLI, F.; DE PONTI, F.; CASTELLETI, C.A.; FRIGO, G.M. Selectivity of Ca^{+2} channel blockers in inhibiting muscular and nerve activities in isolated colon. *Br. J. Pharmacol.* 102: 735-741, 1991.
- LEMAITRE, A, CHATE, H., MANNEVILLE, P. Cluster expansion for collective behavior in discrete-space dynamical systems. *Physical Review Letters.* 77:486-489, 1996.
- LEVESQUE, L.; LARRIVEE, J.F.; BACHVAROV, D.R.; RIOUX, F.; DRAPEAU, G.; MARCEAU, F. Regulation of kinin-induced contraction and DNA synthesis by inflammatory cytokines in the smooth muscle of the rabbit aorta. *Br.J. Pharmacol.*, 116, 1673-1679, 1995.
- LEWIS, G.P. Plasma kinin and other vasoactive compound in acute inflammation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 116:847-854, 1964.
- LI Q.; VERMA, I.M. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat. Ver. Immunol.* 2:725-734, 2002.
- LIEBMANN, C. BÖHMER, F.D. Signal transduction pathways of G protein-coupled receptors and their cross-talk with receptor tyrosine kinases: lessons from bradykinin signalling. *Curr. Med. Chem.* 7: 911-943, 2000.
- LIEBMANN, C. Bradykinin signalling to MAP-kinase: cell-specific connections versus principle mitogenic pathways. *Biol. Chem.* 382: 49-55, 2001.
- LINZ, W.; WIEMER, G.; GOHLKE, P.; UNGER, T.; SCHOLKENS, B. A. Contribution of kinins to the crdiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Pharmacol. Rev.*, 47, 25-49, 1995.
- LIU, W.; REINMUTH, N.; STOELTZING, O.; PARIKH, A.A.; TELLEZ, C.; WILLIAMS, S.; JUNG, Y.D.; FAN, F.; TAKEDA, A.; AKAGI, M.; BAR-ELI, M.; GALLICK, G.E.; ELLIS, L.M. Cyclooxygenase-2 is up-regulated by interleukin-1 beta in human

- colorectal cancer cells via multiple signaling pathways. *Cancer Res.* 63: 3532-3636, 2003.
- LLINÁS, R.; SUGIMORI, D.; HILLMAN, E.; CHERSEY, B. Distribution and functional significance of P-type voltage-dependent Ca^{+2} channels in the mammalian central nervous system. *Trends Neuros.* 15: 351-355, 1992.
- MA, J.X.; WANG, D.Z.; WARD, D.C.; CHEN, L.; DESSAI, T.; CHAO, J.; CHAO L. Structure and chromosomal localisation of the gene (BDKRB2) encoding human bradykinin B_2 receptor. *Genomics*, 23, 362-369, 1994a
- MA, J.X.; WANG, D.Z.; CHAO, L.; CHAO, J. Cloning, sequence analysis and expression of the gene encoding the mouse bradykinin B_2 receptor. *Gene*, 149, 283-288, 1994b.
- MACDONALD, R.J.; MARGOLIUS, H.S.; ERDOS, E.G. Molecular biology of tissue kallikrein. *Biochem. J.*, 253, 313-321, 1988.
- MACNEIL, T., BIERILLO, K.K., MENKE, J.G., HESS, J.F. Cloning and pharmacological characterization of a rabbit bradykinin B_1 receptor. *Biochim. Biophys. Acta Gene Struct. Expres.*, 1264:223-228, 1995.
- MAHABEER, R.; BHOOLA, K.D. Kllikrein and kinin receptor genes. *Pharmacol. Ther.*, 88, 77-89, 2000.
- MAKAROV, S.S. NF-KB as therapeutic target in chronic inflammation: recent advances. *Mol. Med. Today.* 6: 441 – 448, 2000.
- MANNING, G., WHYTE, D.B., MARTINEZ, R., HUNTER, T., SUDARSANAM, S. The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 298:1912-1934, 2002.
- MARCEAU, F., ST-PIERRE, S., REGOLI, D. Kinin receptors in experimental inflammation. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 58:536-542, 1980.
- MARCEAU, F.; LARRIVEE, J.F.; SAINT-JACQUES, E.; BACHVAROV, D.R. The kinin B_1 receptor: an inducible G protein coupled receptor. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 75, 725-731, 1997.
- MARCEAU, F.; BACHVAROV, D.R. Kinin receptors. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, 16, 385-401, 1998.
- MARCEAU, F.; HESS, J.F.; BACHVAROV, D.R. The B_1 receptors for kinins. *Pharmacol. Rev.* 50, 357-386, 1998.
- MARCEAU, F.; LARRIVEE, J.F.; BOUTHILLIER, J.; BACHVAROVA, M.; HOULE, S.; BACHVAROV, D.R. Effect of endogenous kinins, prostanoids, and NO on kinin B_1 and B_2 receptor expression in the rabbit. *Am. J. Physiol.*, 277, R1568-R1578, 1999.
- MARFURT, C.F.; KINGSLEY, R.E.; ECHTENKAMP, S.E. Sensory and sympathetic innervation of the mammalian cornea. A retrograde tracing study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 30:461-472, 1989.
- MARTIN, R.; HOETH, M.; HOFER-WARBINEK, R.; SCHMID, J.A. The transcription factor NF-kappa B and the regulation of vascular cell function. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20:E83-88, 2000.
- MASFERRER, J.L.; SEIBERT, K.; ZWEIFEL, B.S.; NEEDLEMAN, P. Endogenous glucocorticoids regulate an inducible cyclooxygenase enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 89:3971-3921, 1992.
- MASFERRER, J.L.; ZWEIFEL, B.S.; SEIBERT, K.; NEEDLEMAN, P. Selective regulation of cellular cyclooxygenase by dexamethasone and endotoxin in mice. *Clin. Invest.* 86:1375-1379, 1990.

- MASUDA, Y.; YAMAHARA, N.S.; TANAKA, M. Characterization of muscarinic receptors mediating relaxation and contraction in the rat iris dilator muscle. *Br. J. Pharmacol.*, 114, 769–776, 1995.
- MATSSON-WIKBERG, A., WIKBERG, J.E.S., UHLÉN, S. Characterization of α_2 -adrenoceptor subtypes in the porcine eye: identification of α_{2A} -adrenoceptors in the choroid, ciliary body and iris, and α_{2A} - and α_{2C} -adrenoceptors in the retina. *Exp. Eye. Res.* 63, 57-66, 1996.
- MATSSON-WIKBERG, A., WIKBERG, J.E.S., UHLÉN, S. Characterization of α_1 -adrenoceptor subtypes in the eye. *Exp. Eye. Res.* 70, 51-60, 2000.
- MATSUO, T.; CYNADER, M.S. Localization of alpha-2 adrenergic receptors in the human eye. *Ophthalmic Res.* 24:213-219, 1992.
- McEACHERN, A.E; SHELTON, E.R.; BHAKTA, S.; OBERNOLTE, R.; BACH, C.; ZUPPAN, P., FUJISAKI, J. ALDRICH, R.W.; JARNAGIN, K. Expression cloning of rat B₂ bradykinin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA.*, 88:7724-7728, 1991.
- MCLEAN, P.G.; AHLUWALIA, A.; PERRETTI, M. Association between kinin (B₁) receptor expression and leukocyte trafficking across mouse mesenteric postcapillary venules. *J. Exp. Med.*, 192, 367-380, 2000.
- MCLEAN, P.G.; PERRETTI, M; AHLUWALIA, A. Inducible expression of the kinin B₁ receptor in the endotoxemic heart: mechanisms of des-Arg⁹-bradykinin-induced coronary vasodilation. *Br. J. Pharmacol.*, 128, 275-282, 1999.
- McMENAMIN, P.G.; STEPTOE, R.J.; Normal anatomy of the aqueous humour outflow system in the domestic pig eye. *J. Anat.* 178: 65-77, 1991.
- McNAUGHTON, N.C.L.; RANDALL, A.D. Electrophysiological properties of the human N-type Ca⁺² channel: channel gating in Ca⁺², Ba⁺² and Sr⁺² containing solutions. *Neuropharmacol.* 36: 895-915, 1997.
- MEDEIROS, R., CABRINI, DA, FERREIRA, J., FERNANDES, E.S., MORI, M.A, PESQUERO, JB, BADER, M., AVELLAR, MC, CAMPOS, M.M., CALIXTO, JB. Bradykinin B₁ receptor expression induced by tissue damage in the rat portal vein: a critical role for mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappa B signaling pathways. *Circ. Res.* 94:1375-1382, 2004.
- MEDEIROS, R.; CABRINI, D.A.; CALIXTO, J.B. The *in vivo* and *ex vivo* roles of cyclooxygenase-2, nuclear factor-kb and protein kinases pathways in the up-regulation of B₁ receptor mediated contraction of the rabbit aorta. *Regul. Pept.* 97: 121-130, 2001.
- MEDZHITOV, R., JANEWAY, C.A, JR. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.* 9:4-9, 1997.
- MENKE, J.G.; BORKOWSKI, J.A.; BIERILO, K.K.; MACNEIL, T.; DERRICK, A. W.; SCHNECK, K.A.; RANSOM, R.W.; STRADER, C.D.; LINEMEYER, D.L.; HESS, J.F. Expression cloning of a human B₁ bradykinin receptor. *J. Biol. Chem.*, 269, 21583-21586, 1994.
- MITTAG, T.W.; TORMAY, A. Adrenergic receptor subtypes in rabbit iris-ciliary body membranes: classification by radioligand studies. *Exp. Eye. Res.* 40:239-249, 1985.
- MORGAN, D.L., PROSKE, U. Vertebrate slow muscle: its structure, pattern of innervation, and mechanical properties. *Physiol. Rev.*, 64, 103-108, 1984.
- NAU-STAUDT, K.; NAU, W.M.; HAEFLIGER, I. O.; FLAMMER, J. Lipid peroxidation in porcine irises: dependence on pigmentation. *Curr. Eye Res.* 22:229-234, 2001.
- NI, A.; CHAI, K.X.; CHAO, L.; CHAO, J. Molecular cloning and expression of rat bradykinin B₁ receptor. *Biochim. Biophys. Acta.* 1442: 177 – 185. 1998a.

- NI, A.; CHAO, L.; CHAO, J. Transcription factor nuclear κ B regulates the inducible expression of the human B₁ receptor gene in inflammation. *J. Bio. Chem.* 273:2784-2791, 1998b.
- OH, U., HWANG, S.W., KIM, D. Capsaicin activates a nonselective cation channel in cultured neonatal rat dorsal root ganglion neurons. *J. Neurosci.*, 16:1659-1667, 1996.
- OSBORNE, N.N. Binding of (-) [3H] noradrenaline to bovine membrane of the retina. Evidence for the existence of alpha 2-receptors. *Vision Res.* 22:1401-1407, 1982.
- OWENS, G.K. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol. Ver.* 75:487, 1995.
- PAIRET, M., ENGELHARDT, G. Distinct isoforms (COX-1 and COX-2) of cyclooxygenase: possible physiological and therapeutic implications. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 10:1-17, 1996.
- PASSOS, G.F.; FERNANDES, E.S.; CAMPOS, M.M.; ARAUJO, J.G.; PESQUERO, J.L.; SOUZA, G.E.; AVELLAR, M.C.; TEIXEIRA, M.M.; CALIXTO, J.B. Kinin B(1) receptor up-regulation after lipopolysaccharide administration: role of proinflammatory cytokines and neutrophil influx. *J. Immunol.* 172: 1839-1847, 2004.
- PERSSON, H.; SONMARK, B. Adrenoceptors and cholinceptors in the rabbit iris. *Eur. J. Pharmacol.* 15:240-244, 1971.
- PERSSON, K., ANDERSSON, R.G.G. Biphasic response to bradykinin in isolated porcine iliac arteries is mediated by bradykinin B₁ and B₂ receptors. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 31, 306-313, 1998.
- PESQUERO, J.B., ARAUJO, R.C., HEPPESTALL, P.A., STUCKY, C.L., SILVA, J.R., J.A., WALTHER, T., OLIVEIRA, S.M., PESQUERO, J.L., PAIVA, A.C., CALIXTO, J.B. Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B₁ receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 97:8140-8145, 2000.
- PESQUERO, J.B.; PESQUERO, J.L.; OLIVEIRA, S.M.; ROSCHER, A.A.; METZGER, R.; GANTEN, D.; BADER, M. Molecular cloning and functional characterization of a mouse bradykinin B1 receptor gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 220, 219-225, 1996.
- PHAGOO, S.B., REDDI, K.; ANDERSON, K.D.; LEEB-LUNDBERG, L.M.; WARBURTON, D. Bradykinin B₁ receptor up-regulation by interleukin-1 beta and B₁ agonist occurs through independent and synergistic intracellular signaling mechanisms in human lung fibroblasts. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298: 77-85, 2001.
- POWELL, S.J.; SLYNN, G.; THOMAS, C.; HOPKINS, B.; BRIGGS, I.; GRAHAM, A. Human bradykinin B₂ receptor: nucleotide sequence analysis and assignment to chromosome 14. *Genomics*, 15, 435-438, 1993.
- PRADO, G.N., TAYLOR, L., ZHOU, X., RICUPERO, D., MIERKE, D.F., POLGAR, P. Mechanisms regulating the expression, self-maintenance, and signaling-function of the bradykinin B₂ and B₁ receptors. *J. Cell Physiol.*, 193:275-286, 2002.
- PRADO, G.N., TAYLOR, L., ZHOU, X., RICUPERO, D., MIERKE, D.F., POLGAR, P. Mechanisms regulating the expression, self-maintenance, and signaling-function of the bradykinin B₂ and B₁ receptors. *J. Cell Physiol.*, 193:405-408, 1985.
- PREMKUMAR, L.S.; AHERN, G.P. Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. *Nature.*, 408:985-990, 2000.
- PROUD, D. The kinin system in rhinitis and asthma. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, 16, 351-364, 1998.

- PROUD, D.; KAPLAN, A. P. Kinin formation: mechanisms and role in inflammatory disorders. *Annu. Rev. Immunol.*, 6, 49-83, 1988.
- PROUD, D.; MACGLASHAN, D.W.; NEWBALL, H.H.; SCHULMAN, E.S.; LICHTENSTEIN, L.M. Immunoglobulin E-mediated release of a kininogenase from purified human lung mast cells. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 132, 405-408, 1985.
- PRUNEAU, D., LUCCARINI, JM., DEFRENE, E., PAQUET, J.L., BELICHARD, P. Characterisation of bradykinin receptors from juvenile pig coronary artery. *Eur. J. Pharmacol.* 297:53-60, 1996.
- RAIDOO, D.M.; BHOOLA, K.D. Pathophysiology of the kallikrein-kinin system in mammalian nervous tissue. *Pharmacol. Ther.*, 79, 105-127, 1998.
- REGOLI, D.; BARABE, J.; PARK, W.K. Receptors for bradykinin in rabbit aorta. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 55, 855-867, 1977.
- REGOLI, D.; BARABÉ, J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol. Rev.*, 32:1-46, 1980.
- REGOLI, D.C.; MARCEAU, F.; LAVIGNE, J. Induction of beta 1-receptors for kinins in the rabbit by a bacterial lipopolysaccharide. *Eur. J. Pharmacol.*, 71, 105-115, 1981.
- REGOLI, D.; GOBIEL, F.; NGUYEN, Q.T.; JUKIC, D.; SEONE, P.R.; SALVINO, J.M.; SAWUTZ, D.G. Bradykinin receptor types and B₂ subtypes. *Life Sci.* 55: 735-749, 1994.
- REGOLI, D.; ALLOGHO, S.N. RIZZI, A.; GOBEIL, F.J. Bradykinin receptors and their antagonists. *Eur.J.Pharmacol.* 348: 1-10, 1998.
- REGOLI, D., RIZZI, A, PERRON, S.I., GOBEIL, F Jr. Classification of kinin receptors. *Biol. Chem.* 382:31-35, 2001.
- RIZZI, A., GOBEIL, F., CALO, G., INAMURA, N., REGOLI, D. FR173657: a new, potent, nonpeptide kinin B₂ receptor antagonist. An in vitro study. *Hypertension*, 29: 951-956, 1997.
- ROCHA E SILVA, M.; BERALDO, W.T.; RSENFELD, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am. J. Physiol.*, 156, 261-273, 1949.
- SABOURIN, T.; MORISSETTE, G.; BOUTHILLIER, J.; LEVESQUE, L.; MARCEAU, F. Expression of Kinin B(1) receptor in fresh or cultured rabbit aortic smooth muscle: role of NF-kappa B recruitment. *Nat.Immunol.* 3:60-75, 2001.
- SABOURIN, T., MORISSETTE, G., BOUTHILLIER, J., LEVESQUE, L., MARCEAU, F. Expression of kinin B(1) receptor in fresh or cultured rabbit aortic smooth muscle:role of NF-kappa B. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 283:H227-237, 2002.
- SALVINO, J.M.; SEOANE, P.R.; DOUTY, B.D.; AWAD, M.M.; DOLLE, R.E.; HOUCK, W.T.; FAUNCE, D.M.; SAWUTZ, D.G. Design of potent nonpeptide competitive antagonists of the human bradykinin B₂ receptor. *J. Med. Chem.*, 36, 2583-2584, 1993.
- SANTICIOLI, P., CATALIOTO, R.M., MEINI, S., MAGGI, C. A. Differences in electromechanical coupling between bradykinin and the nonpeptide kinin B₂ receptor agonist, FR 190997, in the circular muscle of guinea-pig colon. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 363:175-181, 2001.
- SANTORO, M.G.; ROSSI, A.; ANUCUM C. NF-KappaB and virus infection: who controls whom. *EMBO J.* 22:2552-2560, 2003.
- SARDI, S.P.; PEREZ, H.; ANTÚNEZ, P.; ROTHLIN, R.P. Bradykinin B₁ receptors in human umbilical vein. *Eur. J. Pharmacol.* 321: 33 – 38, 1997.

- SARDI, S.P.; DARAY, F.M.; ERRASTO, A.E.; PELOROSSO, F.G.; PUJOL-LEREIS, V.A.; REY-ARES, V.; ROGINES-VELO, M.P.; ROTHLIN, R.P. Further pharmacological characterization of bradykin B₁ receptor up-regulation in human umbilical vein. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290: 1019-1025, 1999.
- SARDI, S.P.; ERRASTI, A. E.; REY-ARES, V.; ROGINES-VELO, M.P.; ROTHLIN, R.P. Bradykinin B₁ receptor in isolated human umbilical vein: an experimental model of the *in vitro* up-regulation. *Acta Pharmacol. Sinica.* 21: 105 – 110, 2000.
- SARDI, S.P., REY-ARES, V., PUJOL-LEREIS, V.A, SERRANO, S.A, ROTHLIN, R.P. Further pharmacological evidence of nuclear factor-kappa B pathway involvement in bradykinin B₁ receptor-sensitized responses in human umbilical vein. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 301:975-980, 2002.
- SCHANSTRA, J.P.; BATAILLÉ, E.; CASTAÑO, M.E.M.; BARASCUD, Y.; HIRTZ, C.; PESQUERO, J.B.; PECHER, C.; GAUTHIER, F.; GIROLAMI, J-P.; BASCANDS, J.L. The B1-agonist [des-Arg10]-kallidin activates transcription factor NF-κB and induced homologous up-regulation of the bradykinin B₁-receptor in cultured human lung fibroblasts. *J. Clin. Invest.*, 101, 2080 – 2091, 1998.
- SCHANSTRA, J. P., ARLIC, C., MARIN-CASTANO, M.B., GIROLAMI, J. BASCANDS, J. Renal bradykinin receptors: localisation, transduction pathways and molecular basis for a possible pathological role. *Int. J. Mol. Med.*, 3:185-191, 1999.
- SCHWINN, D.A. Adrenergic receptors: unique localization in human tissues. *Adv. Pharmacol.* 31:333-341, 1994.
- SOMLYO, A.P., SOMLYO, A.V. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature*, 372:231, 1994.
- SPEEDING, M., PAOLETTI, R. Classification of calcium channels and the sites of action of drugs modifying channel function. *Pharmacol. Rev.* 44: 363 – 376, 1992.
- STEWART, J.M.; GERA, L.; YORK, E.J.; CHAN, D.C.; BUNN, P. Bradykinin antagonists: present progress and future prospects. *Immunopharmacology.* 43:155-161, 1999.
- STONE, R.A.; KUWAYAMA, Y. Substance P-like immunoreactive nerves in the human eye. *Arch. Ophthalmol.* 103:1207-1211, 1985.
- SU, D.S., MARKOWITZ, M.K., DIPARDO, R.M., MURPHY, K.L., HARRELL, C.M., O'MALLEY, S.S., RANSON, R.W., CHANG, R.S., HÅS, HESS, F.J., PETTIBONE, D.J., MASON, G.S., BOYCE, S., FREIDINGER, R.M., BOCK, M.G. Discovery of a potent, non-peptide bradykinin B₁ receptor antagonist. *J.Am. Chem.Soc.*, 125:7516-7517, 2003.
- TAIWO, Y.O.; LEVINE, J.D. Characterization of the arachidonic acid metabolites mediating bradykinin and noradrenaline hyperalgesia. *Brain Res.* 458:402-406, 1988.
- TAK, P.P.; FIRESTEIN, G.S. NF-κB: a key role in inflammatory diseases. *J. Clin. Invest.* 107:7-11, 2001.
- TANOUE, T., NISHIDA, E. Molecular recognitions in the MAP kinase cascades. *Cell Signal.*, 15:455-462, 2003.
- TONSUN, M.; PAUL, R.J.; RAPAPORT, R.M. Role of extracellular Ca⁺² influx via L-type and non L-type Ca⁺² channels in thromboxane A₂ receptor-mediated contraction in rat aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 284: 921-928, 1998.
- TORIS, C.B.; TAFOYA, M.E.; CAMRAS, C.B.; YABLONSKI, M.E. Effects of apraclonidine on aqueous humor dynamics in human eyes. *Ophthalmology.* 102:456-461, 1995.

- TRIANTAFILOU, M.; TRIANTAFILOU, K. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol.* 23:301-304, 2002.
- TRIFILIEFF, A., SILVA, A., LANDRY, Y., GIES, J.P. Effect of Hoe 140, a new B₂ noncompetitive antagonist, on guinea pig tracheal bradykinin receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 263, 1377-1382, 1992.
- TRYBUS, K.M. Regulation of smooth muscle myosin. *Cell*, 18:81, 1991.
- UEDA, N., MURAMATSU, I., HAYASHI, H., FUJIWARA, M. Trigeminal nerve the possible origin of substance P-ergic response in isolated rabbit iris sphincter muscle. *Life Sci.* 31, 369-375, 1982.
- UEDA, N., MURAMATSU, I., FUJIWARA, M. Capsaicin and bradykinin-induced substance P-ergic responses in the iris sphincter muscle of the rabbit. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 230:469-473, 1984.
- UENO, A.; DEKURA, E.; KOSUGI, Y.; YOSHIMURA, M.; NARABA, H.; KOJIMA, F.; OH-ISHI, S. Effects of dexamethasone and protein kinase C inhibitors on the induction of bradykinin B₁ mRNA and the bradykinin B₁ receptor-mediated contractile response in isolated rat ileum. *Biochem. Pharmacol.* 63:2043-2053, 2002.
- UNDEM, B.J.; KOLLARIK, M. Characterization of the vanilloid receptor 1 antagonist iodo-resiniferatoxin on the afferent and efferent function of vagal sensory C-fibers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 303:716-722, 2002.
- VAN ESSEN, D.C., ANDERSON, C.H., FELLEMAN, D.J. Information processing in the primate visual system: an integrated systems perspective. *Science*, 255:419-426, 1992.
- VAN HAERINGEN, N.J., VAN SORGE, AA, CARBALLOSA CORE-BODELIER, V.M. Constitutive cyclooxygenase-1 and induced cyclooxygenase-2 in isolated human iris inhibited by S (+) flurbiprofen. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 16:353-361, 2000.
- VAVREK, R.; STUART, J.M. Competitive antagonists of bradykinin. *Peptides*, 6: 161-164, 1985.
- VERECZKEY, C. Coexistence and plasticity of neurotransmitters and neuropeptides in the rat iris. *Acta Histochem.* 91:113-30, 1991
- WAHLESTEDT, C.; BYNKE, G.; HAKANSON, R. Pupillary constriction by bradykinin and capsaicin: mode of action. *Eur. J. Pharmacol.*, 106:577-583, 1985.
- WALKER, K.; PERKINS, M.; DRAY, A. Kinin and kinin receptors in the nervous system. *Neurochem. Int.* 26:1-16, 1995.
- WANG, Z.Y.; HAKANSON, R. The electrically-evoked tachykinin-mediated contractile response of isolated rabbit iris sphincter muscle involves NK₁ receptors only. *Eur. J. Pharmacol.* 216: 327-329, 1992.
- WANG, Z.Y., HAKANSON, R. Effects of ruthenium red and capsazepine on C-fibres in the rabbit iris. *Br. J. Pharmacol.* 110, 1073-1078, 1993.
- WANG W., SCHULTZ, H.D., MA, R. Cardiac sympathetic afferent sensitivity is enhanced in heart failure. *Am. J. Physiol.*, 277: 812 – 817, 1999.
- WANG Y., SOUKHOVA, G., PROCTOR, M., WALKER, J., YU, J. Bradykinin causes hypotension by activating pulmonary sympathetic afferents in the rabbit. *J. Appl. Physiol.* 95: 233-240, 2003.
- WEBB, R.C. Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv. Physiol. Educ.* 27: 201-206, 2003.
- WHALLEY, E.T., FRITZ, H., GEIGER, R. Kinin receptors and angiotensin converting enzyme in rabbits basilar arteries. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 336:229-301, 1983.

- WHITMARSH, A. J.; DAVIS, R.J. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J. Mol. Med.*, 74, 589 – 607, 1996.
- WOOD, M.R., KIM, J.J., HAN, W., DORSEY, B.D., HOMNICK, C.F., DIPARDO, R.M., KUDUK, S.D., MACNEIL, T., MURPHY, K.L., LIS, EV., RANSOM, R.W., STUMP, G.L., LYNCH, J.J., O'MALLEY, S.S., MILLER, P.J., CHEN, T.B., HARRELL, CM., CHANG, R.S., SANDHU, P., ELLIS, J.D., BONDISKEY, P.J., PETTIBONE, D.J., FREIDINGER, R.M., BOCK, M.G. Benzodiazepines as poent and selective brdykinin B₁ antagonists. *J. Med. Chen.* 46: 1803-1806, 2003.
- WOODHOUSE, J.M. The effect of pupil size on grating detection at various contrast levels. *Vision Res.* 15: 645-648, 1975.
- WOTHERSPOON, G., WINTER, J. Bradykinin B₁ receptor is constitutively expressed in the rat sensory nervous system. *Neurosci. Lett.* 294:175-178, 2000.
- XIONG, W.H.; NAKATANI, K.; YE, B.; YAU, K.W. Protein kinase C activity and light sensitivity of single amphibian rods. *J. Gen. Physiol.*, 110: 441-452, 1997.
- YANG, X., POLGAR, P. Genomic structure of the human bradykinin B₁ receptor gene and preliminary characterization of its regulatory regions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 222:18-725, 1996.
- YANG, X., TAYLOR, L., POLGAR, P. Mechanisms in the transcription regulation of bradykinin B₁ receptor gene expression. *J. Biol. Hem.* 273:10763-10770, 1998.
- ZADORODNYUK, V.; SANTICIOLI, P.; MAGGI, C.A. Different Ca⁺² influx pathways mediated tachykinin receptor-induced contraction in circular muscle of guinea-pig colon. *Eur. J. Pharmacol.* 255: 9-15, 1994.
- ZHANG, S.Q., BUTLER, J.M., OHARA, K., COLE, D.F. Sensory neural mechanisms in contraction of isolated sphincter pupillae: the role for substance P and the effects of sensory denervation on the responses to miotics. *Exp. Eye Res.* 35, 43-54, 1982.
- ZHU, G.Q., PATEL, K.P., ZUCKER, I.H., WANG, W. Microinjection of ANG II into paraventricular nucleus enhanced cardiac sympathetic afferent reflex in rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 282: 2039 – 2045, 2002.
- ZUANY-AMORIM, C.; MANLIUS, C.; TRIFILIEFF, A.; BRUNET, L.R.; ROOK, G.; BOWEN, G.; PAY, G.; WALKER, C. Long-term protective and antigen-specific effect of heat-killed mycobacterium vaccae in a murine model of allergic pulmonary inflammation. *J. Immunol.* 169:1492-1499, 2002.